

**Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek**

**Martina Mužic**

**Učinak visokog intenziteta svjetlosti na okruglolisnu rosiku  
(*Drosera rotundifolia* L.)**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2014.**

Ovaj je rad izrađen na Biološkom odsjeku, u Laboratoriju za fiziologiju bilja u Botaničkom zavodu Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva magistra edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Od srca se zahvaljujem asistentici dr. sc. Mariji Babić na ukazanom povjerenju, strpljenju, korisnim savjetima i velikoj pomoći u eksperimentalnom radu te pregledu cjelokupnog diplomskog rada. Veliko hvala što ste nesebično prenijeli na mene svoje znanje i na prijateljskim razgovorima zbog kojih mi je izrada ovog diplomskog rada bila puno jednostavnija.

Hvala svim kolegama i prijateljima bez kojih studij ne bi prošao tako zanimljivo i zabavno.

Martina, Danijela, Petra, Mateja, Tihana i Ksenija hvala vam što ste mi pomagale, savjetovala i podržavale u svim životnim trenucima te proživljavale sa mnom sve moje uspone i padove pa tako i ispite.

Posebno se zahvaljujem roditeljima i bratu koji su mi svojim odricanjima omogućili studiranje. Uvijek ste mi u životu bili uzor, potpora i motivacija, stoga je ovaj rad i napravljen za ponos vama i meni.

Najveća zahvala ide mojem Nikoli što mi je bio najveća moguća motivacija da svoj studij privedem kraju. Hvala na razumijevanju, neizmjerljivoj ljubavi, beskrajnoj podršci i vjeri u moj uspjeh.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### Učinak visokog intenziteta svjetlosti na okruglolisnu rosiku (*Drosera rotundifolia* L.)

Martina Mužic

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Okruglolisna rosika (*Drosera rotundifolia* L.) mesojedna je biljka koja nastanjuje rijetka cretna staništa u Hrvatskoj kojima prijeti nestajanje. Metodom košnje visoke vegetacije pokušava se spriječiti zarašćivanje cretova, pri čemu se biljke prilagođene na uvjete sjene naglo izlažu uvjetima visokog intenziteta svjetlosti. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi promjene u učinkovitosti fotosinteze te promjene u sadržaju i sastavu fotosintetskih pigmenata i fenolnih spojeva nakon što rosike, koje smo uzgojili u uvjetima sjene, izložimo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) u trajanju od 5, 30, 50 i 100 sati. Nakon izlaganja biljke koje su 5 i 100 sati bile izložene visokom intenzitetu svjetlosti, stavljene su 7 dana na oporavak u uvjete niskog intenziteta svjetla. Kontrolna grupa biljaka bila je izložena niskom intenzitetu svjetlosti ( $40 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te je predstavljala biljke koje žive u sjeni. Izlaganje biljaka visokom intenzitetu svjetlosti dovelo je do smanjenja vrijednosti optimalnog prinosa i stope prijenosa elektrona, a porasla je vrijednost nefotokemijskog gašenja. Tijekom izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti u biljkama je izmjeren niži udio klorofila u tkivu te povećan udio karotenoida, a povećali su se i udjeli fenola, tanina, flavonoida i antocijana. Ovi rezultati ukazuju da je izlaganje visokom intenzitetu svjetlosti dovelo do preopterećenosti fotosintetskog aparata i fotoinhibicije. Međutim došlo je i do prilagođavanja biljaka jer je za očekivati da će se zbog manjeg udjela klorofila smanjiti apsorpcija energije, odnosno povišenjem udjela karotenoida povećat oslobađanje viška energije u obliku topline što će zaštititi fotosintetski aparat od svjetlosnog stresa. Osim toga, uočeno povećanje udjela fenolnih spojeva u tkivu također može imati ulogu u zaštiti biljaka od oksidacijskog stresa uzrokovanog svjetlosnim stresom i/ili u smanjenju apsorpcije svjetlosne energije.

(49 stranica, 14 slika, 1 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** svjetlosni stres, fluorescencija klorofila *a*, fotosintetski pigmenti, fenolni spojevi, reaktivni kisikovi spojevi, rosika

**Voditelj:** Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

**Neposredni voditelj:** Dr. sc. Marija Babić

**Ocjenitelji:** Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.  
Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.  
Dr. sc. Zora Popović, prof.

**Rad prihvaćen:** 12.09.2014

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Effect of high radiation on roundleaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.)**

Martina Mužic

Rooseveltovtrg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Roundleaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) is a carnivorous plant that inhabits peat-bog areas which are rare in Croatia and in danger of extinction. Proposed mowing treatment of high vegetation prevents the disappearance of peat-bogs due to overgrowth, but also exposes shade-acclimated plants to high light conditions. The aim of this study was to determine the changes in photosynthetic efficiency well as content of photosynthetic pigments and phenolic compounds in shade-acclimated plants exposed to high light intensity radiation ( $700 \pm 20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for 5, 30, 50 and 100 h. Plants exposed to 5 and 100 h of high-light radiation were brought to the 7 days recovery under low light intensity. The control group of plants were grown under low intensity radiation ( $40 \pm 20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and represented shade-acclimated plants. The sudden exposure of shade-acclimated plants to high light intensity decreased the fluorescence-based maximal quantum yield of PSII and rate of electron transfer, but increased the value of non-photochemical quenching. Following high light exposure the plants have reduced the chlorophyll content in tissue, but increased carotenoids content as well as content of total phenols, tannins, flavonoids and anthocyanins. These results suggest that the exposure to high light intensity led to an overload of the photosynthetic apparatus and photoinhibition. However, acclimatization of plants was also observed because it is expected that the lower chlorophyll content would result in reduced energy absorption while increased carotenoids could dissipate excess energy thus protecting photosynthetic apparatus from excess light. In addition observed increase of phenolic compounds would protect plants from oxidative stress and/or further reduce the absorption of excess light energy.

(49 pages, 14 figures, 1 tables, 47 references, original: in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

**Key words:** light stress, fluorescence of chlorophyll *a*, photosynthetic pigments, phenolic compounds, reactive oxygen species, sundew

**Supervisor:** Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.

**Assistant Supervisor:** Dr. Marija Babić

**Reviewers:** Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.  
Dr. sc. Ines Radanović, Assoc.Prof.  
Dr. sc. Zora Popović, Prof.

**Thesis accepted:** 12.09.2014

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. OKRUGLOLISNA ROSIKA	1
1.2. SVJETLOST	3
1.3. FOTOSINTEZA	5
1.4. FOTOSINTETSKI PIGMENTI	6
1.5. FENOLNI SPOJEVI	8
1.5.1. Flavonoidi	8
1.5.2. Tanini	9
1.6. SVJETLOSNI STRES	10
1.7. FLUORESCENCIJA KLOROFILA <i>a</i>	12
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	14
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	15
3.1 BILJNI MATERIJAL	15
3.1.1 Multiplikacija u uvjetima <i>in vitro</i>	15
3.1.2 Aklimatizacija na uvjete <i>ex vitro</i>	17
3.1.3. Izvođenje pokusa	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> u uvjetima <i>in vivo</i>	19
3.2.2. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje fotosintetskih pigmenata	21
3.2.3. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana	22
3.2.3.1. Određivanje udjela ukupnih fenola u tkivu	22
3.2.3.2. Određivanje udjela tanina u tkivu	23
3.2.3.3. Određivanje udjela flavonoida u tkivu	23
3.2.3.4. Određivanje udjela antocijana u tkivu	24
3.2.4. Statistička obrada podataka	24
<b>4. REZULTATI</b>	25
4.1. Utjecaj visokog intenziteta zračenja na fluorescenciju klorofila <i>a in vivo</i>	26
4.1.1. Optimalni prinos fluorescencije	26
4.1.2 Stopa prijenosa elektrona	27
4.1.3. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije	28
4.2. Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na fotosintetske pigmente	29
4.2.1. Udio klorofila <i>a</i> u tkivu	29
4.2.2. Udio klorofila <i>b</i> u tkivu	30
4.2.3. Udio ukupnih karotenoida u tkivu	31
4.2.4. Omjeri klorofila <i>a</i> i <i>b</i> te karotenoida i ukupnih klorofila	32
4.3. Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na fenolne spojeve	33
4.3.1. Udio ukupnih fenola u tkivu	33
4.3.2. Udio flavonoida u tkivu	34
4.3.4. Udio antocijana u tkivu	35
<b>5. RASPRAVA</b>	36
5.1. Učinak visokog intenziteta osvjetljenja na fotosintezu okruglolisne rosike	37
5.2. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na fotosintetske pigmente okruglolisne rosike	40
5.3. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na fenolne spojeve okruglolisne rosike	42
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	45
<b>7. LITERATURA</b>	46

## 1. UVOD

Biljke koje žive u močvarnom području suočile su se sa problemom nedostatka minerala u tlu. Minerali su potrebni biljci za normalan rast i razvoj. Neke biljke problem nedostatka riješile su novim načinom prehrane, pa su iz listova razvile zamke pomoću kojih hvataju razne kukce. Biljke koje su se specijalizirale da love, enzimski razgrade te crpe hranjive tvari iz kukaca da nadomjeste nedostatak minerala iz tla, nazivamo mesojednim biljkama. Mesojedne biljke su autotrofni organizmi koje vrše proces fotosinteze, no zbog načina ekstrakcije minerala iz kukaca neki znanstvenici ih svrstavaju u heterotrofne organizme (Król i sur. 2011). U ovu skupinu biljaka pripada i okruglolisna rosika koja je dobila ime prema obliku lista i kapljicama tekućine koje sjaje na suncu poput rose.

### 1.1. OKRUGLOLISNA ROSIKA

Okruglolisna rosika (*Drosera rotundifolia* L.) je višegodišnja biljka s promjerom rozete od 6 cm iz čijeg središta izlaze maleni okrugli listovi sa brojnim duguljastim dlačicama (tentakuli) crvene ili zelene boje. Tentakuli na samom vrhu izlučuju prozirnu, mirisnu, ljepljivu i enzimsku tekućinu koja služi za privlačenje, hvatanje i razgradnju raznih kukaca (Slika 1). Kukac privučen mirisom prilijepi se za ljepljive tentakule. Ljepljiva tekućina zalijepi krila zbog čega kukac ne može odletjeti. Svojim micanjem i pokušajima oslobađanja kukac potiče savijanje sve više tentakula i cijelog lista prema njemu pri čemu ljepljiva tekućina zatvara stigme (otvore za disanje na tijelu kukca) zbog čega se kukac guši. Pomoću enzima koji se nalaze u ljepljivoj sluzi biljka pretvara unutrašnje organe kukca u tekućinu i na kraju upija potrebne minerale, ponekad dok je kukac još živ (Król i sur. 2011). Rosika cvate od sredine lipnja do kraja kolovoza. Cvjetovi su mali i bijele boje, a nalaze se na stapki visokoj do 20 cm. Oprašuje se kukcima ili samostalno, dok vjetar raznosi sjemenke (Nikolić i Topić 2005). Tijekom zime biljka izgubi listove i prezimljava u obliku zimskih pupova (hibernakula) u kojima su mladi listovi savijeni u središtu rozete (Thorén i sur. 2003). Mesojedne biljke su heliofiti koje nalazimo na vodenim staništima s malo minerala te visokim intenzitetom svjetlosti jer samo u takvim uvjetima imaju prednost u odnosu na druge biljke. (Givnish i sur. 1984, Ellison i Gotelli 2001). U uvjetima slabog osvjetljenja, hvatanje kukaca je preskupo za biljku zbog smanjene stope fotosinteze koja nastaje zbog adaptacije listova za karnivornu prehranu i/ili povećane stope disanja zbog energetskih zahtjeva koje privlačenje, hvatanje i probavljanje plijena nosi sa sobom (Givnish i sur. 1984).

U Hrvatskoj, okruglolisna rosika raste na nekoliko lokaliteta unutar močvarnih staništa (cretova) koje izgrađuju mahovine iz roda *Sphagnum*. Cret nastaje raspadanjem donjih dijelova mahovine koje stvaraju specifičan oblik zemlje (treset) kojeg karakterizira velika kiselost ([http://www.wiki-dveri.info/wiki/Cret\\_Dubravica](http://www.wiki-dveri.info/wiki/Cret_Dubravica)).



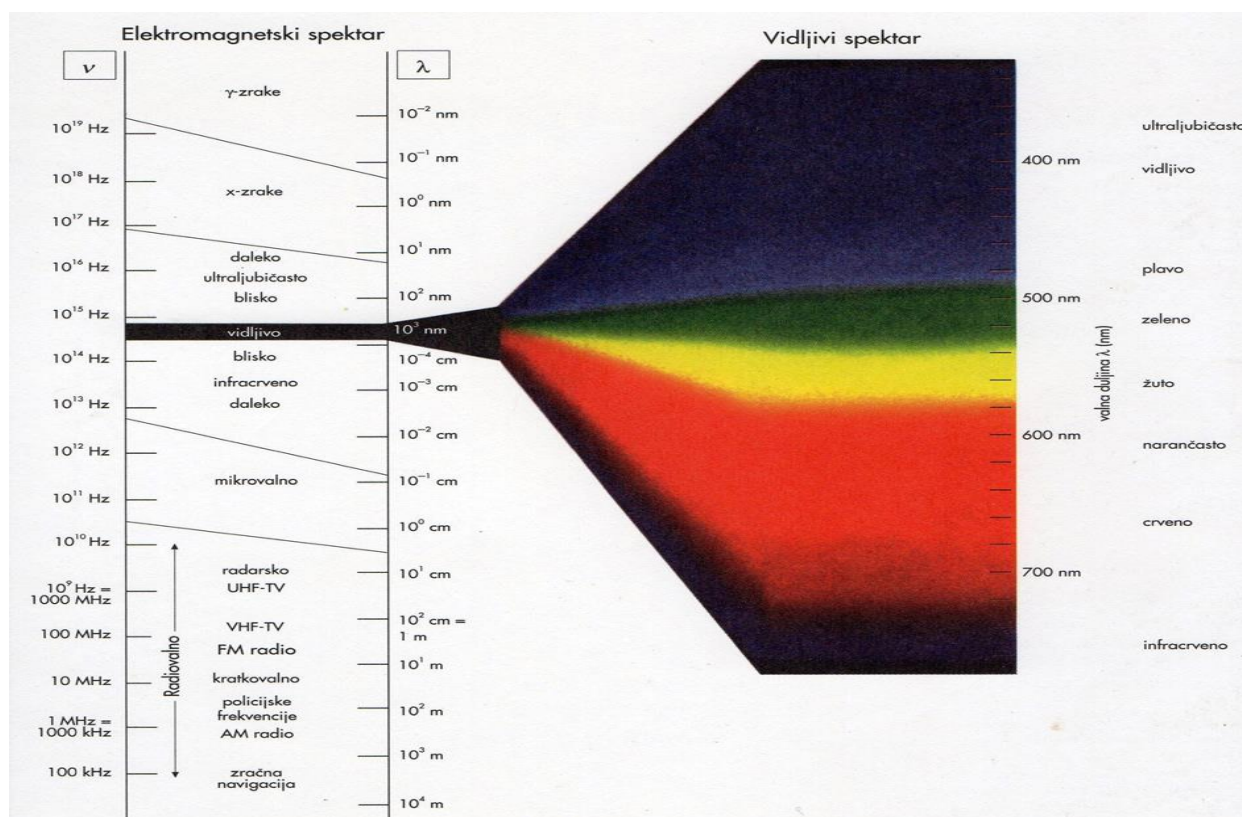
**Slika 1.** *Drosera rotundifolia* L. u staništu u zajednici s mahovinom iz roda *Sphagnum* (autor fotografije: Marija Tolner, Preuzeto sa: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/10692>)

U svojem prirodnom staništu rosike su izložene različitim stresnim čimbenicima (npr. visoki intenziteti svjetlosti, suše, poplave, zarašćivanje itd.) koji utječu na njihov rast i razvoj. Globalnim zatopljenjem i pojavom ozonskih rupa, klima u Hrvatskoj postaje pretopla i presuha pa prijeti potpuni nestanak cretnih staništa zajedno sa svom florom i faunom (Topić i Vukelić 2009).



## 1.2. SVJETLOST

Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja brzinom svjetlosti prolazi prostorom. Zračenju su dana svojstva vala i čestice koja su međusobno komplementarna. Model vala opisuje zračenje pomoću valnih duljina, frekvencija, brzina i amplituda te čini teoriju zračenja razumljivijom. Model čestice opisuje zračenje kao fotone čija je energija razmjerna frekvenciji zračenja te objašnjava ponašanje elektrona kod apsorpcije i emisije. Elektromagnetsko zračenje nastaje u svemiru te obuhvaća veliko područje valnih duljina i frekvencije koje nazivamo elektromagnetski spektar. Elektromagnetski spektar dijeli se na gama ( $\gamma$ ), rendgensko (X), ultraljubičasto (UV), vidljivo (VIS), infracrveno (IR), mikrovalno i radiovalno zračenje (Slika 2). Elektromagnetsko zračenje koje je vidljivo ljudskom oku naziva se svjetlost te čini mali dio ukupnog spektra u rasponu od 380 do 780 nm tj. područje vidljivog dijela spektra (Skoog i sur. 1999).



**Slika 2.** Spektar elektromagnetskog zračenja (preuzeto iz knjige: Skoog i sur. 1999).

Sunce isijava najviše energije u vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja. Zvijezda toplija od Sunca emitira većinu svjetlosti u ultraljubičastom području, a vrlo hladna zvijezda emitira u infracrvenom području. Bijela (Sunčeva) svjetlost sastavljena je od kontinuiranog niza svih boja vidljivog spektra. Tijelo osvijetljeno bijelom svjetlošću apsorbirat će određene valne duljine. Valne duljine koje nisu apsorbirane reflektiraju se od osvijetljenog tijela te predstavljaju boju koju vidimo. Najkraću valnu duljinu imaju ljubičasta i plava svjetlost, slijedi zelena, žuta, narančasta te crvena sa najduljom valnom duljinom (Slika 2).

Za biljke najvažniji dio elektromagnetskog spektra čini vidljiva svjetlost. Iz vidljivog dijela spektra biljke apsorbiraju crvenu svjetlost za fotosintezu te plavu i ljubičastu svjetlost za vegetativni rast i rast korijena, kao i mali dio fotosinteze. Središnji dio vidljivog spektra odgovara zelenoj svjetlosti i ne koristi se u fotosintezi. Tijekom fotosinteze klorofil apsorbira plavu i crvenu svjetlost, a reflektira zelenu svjetlost zbog čega vidimo da su listovi zelene boje (Pevalek - Kozlina 2003).

### 1.3. FOTOSINTEZA

Biljke su fotoautotrofni organizmi koje iz anorganskih tvari primljenih iz okoliša sintetiziraju organske spojeve koristeći se svjetlosnom energijom. U procesu fotosinteze u pigmentima se apsorbira svjetlosna energija i pretvara u kemijsku energiju pomoću koje se ugljikov dioksid iz atmosfere i voda povezuju u brojne organske spojeve poput šećera. Fotosinteza je najvažniji proces koji omogućava život na Zemlji jer se u tom procesu fiksira atmosferski ugljični dioksid, proizvodi se kisik, te nastaju brojni organski spojevi koje koriste heterotrofni organizmi (Pevalek - Kozlina 2003).

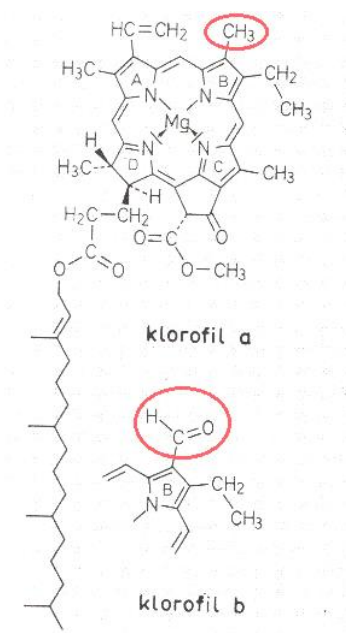
Proces fotosinteze dijeli se na primarne reakcije na svjetlu (fotokemijske reakcije) i sekundarne reakcije (biokemijske reakcije, Calvinov ciklus). Svjetlosne reakcije odvijaju se u mezofilu lista, u tilakoidnim membranama kloroplasta u kojima svjetlost koju apsorbira klorofil *a* pokreće prijenos elektrona od vode do akceptora elektrona  $\text{NADP}^+$  i u tom se procesu cijepa voda te nastaju NADPH, kisik i ATP. Sekundarne reakcije događaju se u stromi kloroplasta gdje se NADPH i ATP koriste za redukciju  $\text{CO}_2$  i sintezu šećera.

U prirodnim uvjetima udio klorofila nije ograničavajući čimbenik fotosinteze jer listovi biljaka koje su u sjeni sadrže redovito više klorofila po jedinici površine lista nego listovi koji su stalno izloženi Sunčevoj svjetlosti. Pri većem intenzitetu svjetlosti stopa fotosinteze će rasti sve dok drugi čimbenici (najčešće  $\text{CO}_2$ ) ne postanu ograničavajući. Kod određenog intenziteta svjetlosti postiže se "svjetlosno zasićenje" pa daljnji porast intenziteta svjetlosti više ne može povećati stopu fotosinteze. Još jače osvjetljenje može oštetiti fotosintetski aparat i dovesti do fotoinhibicije pa stopa fotosinteze opada (Lichtenthaler i Burkart 1999).

## 1.4. FOTOSINTETSKI PIGMENTI

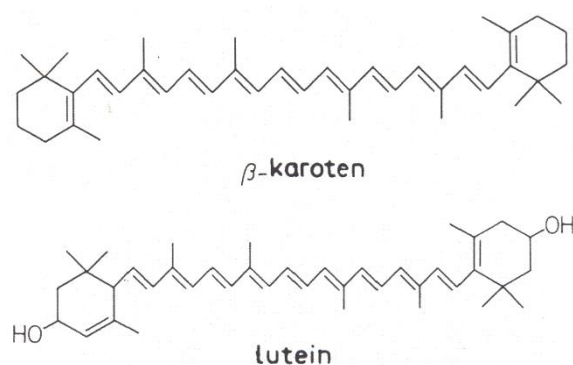
Najaktivnije fotosintetsko tkivo u biljaka je mezofil lista jer sadrži veliki broj kloroplasta (30 - 40 kloroplasta po stanici) koji u svojim tilakoidnim membranama sadrže pigmente kao što su klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi. Svi pigmenti apsorbiraju svjetlost za fotosintezu pri određenim valnim duljinama da što bolje iskoriste vidljivi dio spektra. Klorofil *a* jedini sudjeluje u svjetlosnim reakcijama koje pretvaraju Sunčevu energiju u kemijsku, dok klorofil *b* i karotenoidi apsorbiraju svjetlost i prenose energiju na klorofil *a*, koji se ponaša kao da je sam apsorbirao foton (Pevalek - Kozlina 2003).

Klorofil *a* je plavozelene boje i apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm (plavu svjetlost) i 662 nm (crvenu svjetlost), dok je klorofil *b* žutozelene boje te apsorbira svjetlost valnih duljina 453 nm (plavu svjetlost) i 642 nm (crvenu svjetlost). Osnovna struktura klorofila (Slika 3) je porfirinski sustav koji čine četiri pirolska prstena međusobno povezana metilnim skupinama u prstenasti sustav. U središtu porfirinskog sustava nalazi se polivalentni metal magnezij ( $Mg^{2+}$ ). Pirolski prsten D ima vezan alkohol fitol s 20 C atoma pomoću kojeg se molekula prihvaća za membrane tilakoidnog sustava. Klorofili se međusobno razlikuju po skupinama na pirolskom prstenu B: klorofil *a* ima vezanu metilnu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu (Stryer 1991).



**Slika 3.** Građa molekule klorofila *a* i klorofila *b* (preuzeto iz knjige: Karlson 1993).

Karotenoidi su po građi terpeni koji apsorbiraju svjetlost u modrom području spektra (380 i 550 nm), koje klorofili mogu apsorbirati samo djelomično, pa na taj način proširuju spektar boja koje mogu pokretati fotosintezu. To su linearne molekule ugljikovodika s brojnim konjugiranim dvostrukim vezama, a dijelimo ih na karotene i ksantofile. Karoteni su ugljikovodici narančasto - crvene boje, dok ksantofili, derivati karotena, sadrže kisik i žute su boje. (Slika 4). U prirodi su ksantofili brojniji od karotena (njihov odnos može biti 2:1; Karlson 1993; Stryer 1991).



**Slika 4.** Građa  $\beta$  - karotena i ksantofila luteina (preuzeto iz knjige: Karlson 1993).

U uvjetima previsokih intenziteta svjetlosti karotenoidi fotosintetskog aparata mogu zaštititi klorofil od fotooksidacije. Pri jakom intenzitetu svjetlosti velika količina energije koju pigmenti apsorbiraju ulazi u reakciju s molekularnim kisikom pri čemu nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan te oštećuje fotosintetski aparat. Način na koji karotenoidi štite klorofil od fotooksidacije je apsorpcija viška energije i oslobađanje u obliku topline (Sharma i sur. 2012).

## 1.5. FENOLNI SPOJEVI

Biljke proizvode brojne sekundarne tvari koje sadrže hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. U fenolne spojeve spadaju fenolne kiseline, flavonoidi, tanini i dr. spojevi. Uloge fenolnih spojeva su raznolike, a neke od njih su zaštita od UV i jake svjetlosti, obrana od herbivornih organizama, mehanička potpora, privlačenje oprašivača i rasprostranjivača plodova, redukcija rasta susjednih biljaka i dr. U svojem istraživanju pratila sam utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na udio fenolnih spojeva.

### 1.5.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća skupina organskih spojeva s 15 ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena međusobno povezana s jednim heterocikličkim prstenom. Kod biljaka flavonoidi imaju ulogu u pigmentaciji i obrani. U biljnoj fiziologiji na osnovi stupnja oksidacije heterocikličkog prstena flavonoidi su podijeljeni na: antocijane, flavone, flavonoide i izoflavone.

Antocijani su flavonoidni pigmenti koji cvjetovima, listovima i plodovima daju crveno, ružičasto i plavo obojenje čime pomažu u primamljivanju životinja za oprašivanje cvjetova i rasprostiranje sjemenki. Na boju antocijana utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina na prstenu, prisutnost metala (Fe i Al), prisutnost flavona i flavonskih pigmenata, te pH vrijednost vakuole (Pevalek - Kozlina 2003). Povećana prisutnost antocijana u listovima javlja se kao odgovor na stresne situacije poput UV zračenja, prevelikih intenziteta vidljive svjetlosti, nestašice minerala itd. (Close i Beadle 2003).

Flavoni i flavonoli dvije su glavne skupine biljnih flavonoida koje apsorbiraju svjetlost kraćih valnih duljina nego antocijani i nisu vidljivi ljudskom oku kao neko obojenje, ali su prilagođeni osjetilima nekih oprašivača (npr. kukaca) koji ih mogu vidjeti. Obje skupine su prisutne u cvjetovima i epidermi listova. Njihova najveća uloga je zaštita od UV zračenja te apsorbiraju u području UV - B spektra, a propuštaju fotosintetski aktivne valne duljine (Jaakola i sur. 2004).

### **1.5.2. Tanini**

Tanini su fenolni polimeri relativne molekulske mase (600 - 3000) koji imaju obrambena svojstva. Tanine dijelimo na kondenzirane tanine i tanine koji se mogu hidrolizirati. Zajedničko svojstvo svih tanina je da vežu proteine životinjske kože (kolagene), povećavaju otpornost na toplinu, vodu i mikrobe. Tanini imaju opori okus te su otrovi koji reduciraju rast i preživljavanje herbivora (Close i McArthur 2002).

## 1.6. SVJETLOSNI STRES

Prejak intenzitet osvjetljenja može uzrokovati svjetlosni stres koji djeluje inhibitorno na proces fotosinteze. Fotosinteza ovisi o kvaliteti i količini svjetlosti. Povećanjem intenziteta osvjetljenja intenzitet fotosinteze se u početku linearno povećava, a zatim se postepeno smanjuje i kada se fotosintetski aparat zasiti svjetlošću poprima konstantu vrijednost.

Prema količini svjetlosti koja im je potrebna, biljke dijelimo na biljke sunčanih staništa (heliofite) i na biljke zasjenjenih staništa (skiofite). Kloroplasti unutar stanice okreću se u položaj koji je optimalan za maksimalan prinos fotosinteze. Kod prejakog osvjetljenja kloroplasti se poredaju jedan iza drugog tako da najmanja površina bude izložena svjetlu i tako štite fotosintetski aparat od oštećenja. Također, prema intenzitetu osvjetljenja mijenja se omjer klorofila *a* i *b*. Biljke koje žive na sunčanim i zasjenjenim staništima koriste ove strategije za aklimatizaciju (Murchie i Horton 1997) te sadrže sunčani ili sjenoviti tip kloroplasta ovisno da li su heliofiti ili skiofiti. Sunčani tip kloroplasta se razlikuje od sjenovitoga u građi, sastavu pigmenata i stopi fotosinteze. U samom kloroplastu nalazi se manji broj tilakoida, grane tilakoida su međusobno bliže smještene, a membrana kloroplasta je tanja, također sadrže manje klorofila u tilakoidnim membranama i mjerenjem daju veći omjer klorofila *a* i *b* u usporedbi sa skiofitima (Lichenthaler i Bukart 1999). Kod biljaka koje se postepeno izlažu visokom intenzitetu dolazi do zasićenja svjetlosnom energijom i smanjuje se stopa fotosinteze, a u biljkama koje su naglo izložene visokom intenzitetu osvjetljenja dolazi do gubitka boje listova zbog fotooksidacije klorofila, odnosno do fotoinhibicije. Fotoinhibicija je posljedica svjetlosnog prezasićenja fotosintetskog aparata, uslijed koje se snižavaju stopa fotosinteze, prijenos elektrona i fotofosforilacija. Osim toga, dovodi do stvaranja toksičnih produkata kao što su singletni kisik, hidroksilni radikali i superoksidni anion. Ovi spojevi nespecifično reagiraju s lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama, pigmentima i drugim molekulama, uzrokujući njihovu oksidacijsku razgradnju (Stancato i sur. 2002). Međutim, fotoinhibicija je uglavnom reverzibilna, jer se biljke pomoću različitih mehanizama mogu aklimatizirati na nove svjetlosne uvjete (Walters 2005).

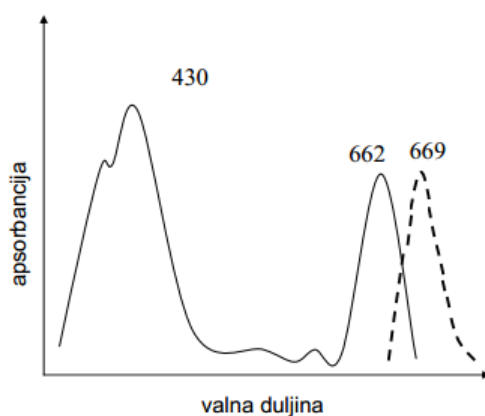


Tako na primjer u uvjetima previsokih intenziteta svjetlosti karotenoidi, koji se nalaze u fotosintetskom aparatu, mogu zaštititi klorofil od fotooksidacije. Pri jakom intenzitetu svjetlosti velika količina energije koju pigmenti apsorbiraju ulazi u reakciju s molekularnim kisikom pri čemu nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan te oštećuje fotosintetski aparat. Karotenoidi preuzimaju suvišak energije od klorofila te je otpuštaju u obliku topline i sudjeluju u reakcijama detoksikacije radikala kisika. Biljka koja se postupno ili trenutno nađe u uvjetima puno jačeg osvjetljenja od onog na koji je biljka prilagođena, povećat će udio karotenoida u ukupnom omjeru fotosintetskih pigmenata. Također doći će do smanjenja koncentracije klorofila kako bi se smanjila apsorpcija svjetlosti odnosno energije (Walters 2005). No ovi mehanizmi ne mogu u potpunosti zaštititi biljke od fotooksidacijskih oštećenja. Zbog toga biljke povećaju sintezu fenolnih spojeva kao što su flavonoidi, antocijani, fenolnih kiselina i tanina koji smanjuju količinu svjetlosne energije dostupne fotosintetskom aparatu (Close i McArtur 2002).

## 1.7. FLUORESCENCIJA KLOROFILA *a*

U kloroplastima zelenih listova molekule fotosintetskih pigmenata su raspoređene u dva fotosistema koja su izgrađena od „antenskih“ molekula klorofila i karotenoida, reakcijskog središta i primarnih akceptora elektrona povezanih s brojnim proteinima. Antenske molekule apsorbiraju svjetlosnu energiju i prenose ju do reakcijskog središta gdje u specijaliziranoj molekuli klorofila *a* dolazi do razdvajanja naboja i predaje elektrona akceptorskoj molekuli. Taj proces predstavlja pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku (Pevalek - Kozlina 2003).

U optimalnim okolišnim uvjetima oko 95% svjetlosne energije se apsorbira uz pomoć fotosintetskih pigmenata i pretvara u kemijsku energiju, a ostatak energije se gubi u obliku topline i fluorescencije. Svi ovi putevi svjetlosne energije su u međusobnoj konkurenciji, pa porast učinkovitosti jednog uzrokuje smanjenje prinosa ostala dva. Energija koja se oslobađa pri fluorescenciji (Slika 5) uvijek je veće valne duljine od apsorbirane svjetlosti, a možemo ju uočiti u crvenom dijelu spektra, pri valnim duljinama nešto većima od maksimuma apsorpcijskog spektra klorofila. Količina svjetlosti oslobođena procesom fluorescencije iznosi 1 – 2% te se određuje pomoću fluorimetra. Mjerenje fluorescencija klorofila *in vivo* jedna je od najčešće korištenih metoda u proučavanju učinaka stresnih uvjeta na fotosintezu (Roger i Weiss 2001).



**Slika 5.** Apsorpcijski spektar klorofila *a* (—) i spektar svjetlosti oslobođene fluorescencijom (- - -). (Preuzeto iz : Vidaković - Cifrek i sur. 2013)

Izmjerena fluorescencija klorofila u listovima potječe iz fotosistema II (PSII). U lancu prijenosa elektrona u tilakoidnim membranama kloroplasta elektroni se s PSII prenose na molekule plastokinona. Intenzitet fluorescencije ovisi o redukcijsko – oksidacijskom stanju plastokinona. Pri niskom intenzitetu svjetlosti, molekule plastokinona su oksidirane te mogu primiti elektrone zbog čega je intenzitet fluorescencije vrlo nizak. Kod jačeg intenziteta osvjetljenja sva apsorbirana svjetlosna energija se ne može iskoristiti jer su plastokinoni reducirani i zbog toga ne mogu primiti elektrone s PSII pa se višak energije oslobađa u obliku fluorescencije. Nakon što se ustali određena stopa prijenosa elektrona i dinamika odvijanja Calvinovog ciklusa, dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije, tzv. gašenja fluorescencije. Razlikuju se dva tipa gašenja fluorescencije: fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje te se prisutnost jednog bez drugoga ne može mjeriti. Fotokemijsko gašenje je pojava smanjenja intenziteta fluorescencije kada je većina akceptora elektrona u lancu prijenosa elektrona oksidirana, tj. raspoloživa za primanje elektrona. Nefotokemijsko gašenje (NPQ) je smanjenje fluorescencije uslijed oslobađanja energije u obliku topline. Jedan od procesa koji doprinosi nefotokemijskom gašenju je ksantofilski ciklus (Maxwell i Johnson 2000).

U sklopu diplomskog rada korištena je metoda saturacijskog pulsa koja omogućuje proučavanje fotosinteze i fotosintetskog aparata u intaktnim organima biljaka izloženih različitim vrstama stresa (Roger i Weiss 2001). Metoda fluorescencije klorofila često se koristi u istraživanjima jer mjereni parametri ukazuju na učinkovitost fotosinteze u stresnim uvjetima i na njihovu prilagodbu tijekom dužeg izlaganja stresnim uvjetima.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Nestankom cretova nestaje i okruglolisna rosika jer je njezin život usko povezan uz mahovine roda *Sphagnum* koje grade cret. Jedan od razloga nestanka cretova je i sukcesija. Kako bi se spriječio nestanak cretova uslijed sukcesije, često se pribjegava metodi košnje vegetacije koja nadrasta i zasjenjuje okruglolisnu rosiku. Tada se biljke koje su duže vremena rasle i prilagodile se uvjetima sjene naglo izlažu uvjetima visokog intenziteta osvjetljenja.

Ciljevi istraživanja su utvrditi učinkovitost fotosinteze i razinu fotosintetskih pigmenata te flavonoida u okruglolisnoj rosiki uzgajanoj u uvjetima niskih intenziteta svjetlosti te nakon izlaganja okruglolisne rosike uvjetima visokog intenziteta svjetlosti. Pretpostavka je da će se u uvjetima kratkog izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti smanjiti stopa fotosinteze te da će doći do fotoinhibicije dok će se tijekom dužeg izlaganja visokom intenzitetu biljka postupno prilagoditi vjerojatno promjenom omjera fotosintetskih pigmenata i povećanom sintezom flavonoida.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 BILJNI MATERIJAL**

Istraživanje sam provela na okruglolisnoj rosiki (*Drosera rotundifolia* L.) koja potječe iz sjemena skupljenog u cretu Dubravica u Hrvatskom zagorju, koje je sterilizirano i uvedeno u kulturu *in vitro*.

##### **3.1.1 Multiplikacija u uvjetima *in vitro***

Rosike sam razmnožila na modificiranoj hranjivoj podlozi MS<sup>1</sup>/<sub>2</sub> (Murashige i Skoog 1962), u kojoj je bila prisutna polovična koncentracija makroelemenata te puna koncentracija mikroelemenata te organskih dodataka (tablici 1). pH vrijednost hranjive podloge podesila sam na vrijednost 5,0 uz dodatak 0,1 M KOH. Nakon dodatka 7 g L<sup>-1</sup> agara hranjivu podlogu sam raspodijelila u staklene epruvete (10 mL/epruveta), začepila vatom i aluminijskom folijom. Epruvete s hranjivom podlogom te metalni pribor (pincete, skalpeli, aluminijske folije) potreban za rad s biljkama sterilizirala sam autoklaviranjem pri 124 °C pri tlaku od 1 atm, u trajanju od 18 minuta. Kuhanje i sterilizaciju hranjivih podloga izvodila sam barem dan prije presađivanja biljaka, tako da se hranjive podloge ohlade na sobnu temperaturu. Sterilizirane hranjive podloge sam do uporabe čuvala u sterilnoj komori.

Tablica 1. Sastav modificirane hranjive podloge MS<sup>1/2</sup> (Murashige i Skoog 1962).

<b>MAKROELEMENTI</b>	mg L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	377,5
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	175
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>MIKROELEMENTI</b>	mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6
CoCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
<b>ORGANSKI DODACI</b>	mg L <sup>-1</sup>
glicin	2,0
m - inozitol	0,1
nikotinska kiselina	0,5
B6	0,5
B1	0,1
saharoza	30

Presadivanje biljaka sa stare na novu hranjivu podlogu izvodila sam u komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka (laminaru). Biljke sam iz epruvete sa starom hranjivom podlogom izvadila pomoću sterilne pincete, odložila na sterilnu aluminijsku foliju te pomoću sterilnog skalpela izdvojila zasebne biljke čije su rozete dostizale promjer u rasponu od 0,5 cm do 1 cm. U svaku epruvetu s novom hranjivom podlogom nasađivala sam po jednu zdravu, lijepu i veličinom ujednačenu biljku. Nakon svakog rukovanja s pojedinom biljkom i nasađivanja, pribor sam dodatno sterilizirala uranjanjem u alkohol i spaljivanjem na plameniku. Radila sam s dva seta pribora jer tek spaljen pribor na plameniku je bio prevruć i mogao je uništiti biljke pa se jedan pribor hladio dok sam s drugim rukovala.

Dovoljan broj biljaka dostigla sam kroz dvije supkulture. Biljke sam na novu hranjivu podlogu presađivala nakon 60 dana.

### **3.1.2 Aklimatizacija na uvjete *ex vitro***

Kad su biljke razmnožene u uvjetima *in vitro* dostigle željenu veličinu, biljke sam izvadila iz epruvete, isprala s njih ostatke agara i uklonila stare listove. Među biljkama sam izabrala primjerke podjednake veličine te ih nasadila u plastične posude koje sam napunila navlaženim tresetom. Posude s biljkama sam prekrila prozirnom folijom kako bih zadržala visoku vlažnost, sličnu onoj kojoj su biljke bile izložene u uvjetima *in vitro*. Foliju sam postepeno uklanjala kako bi se biljke polagano prilagođavale uvjetima atmosferske vlage.

Za vrijeme razmnožavanja u uvjetima *in vitro* te za vrijeme aklimatizacije na uvjete *ex vitro* biljke su uzgajane u klima komori u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla, 8 sati tame), pri intenzitetu svjetla  $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i konstantnoj temperaturi  $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za vrijeme aklimatizacije biljke sam zalijevala destiliranom vodom.

### 3.1.3. Izvođenje pokusa

Pokus je proveden na aklimatiziranim biljkama rosike uzgojenim u klima komori u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla, 8 sati tame). Od ukupno 16 sati osvjetljenja, biljke su 10 sati bile izložene svjetlosti vrlo visokog intenziteta (reflektor Envirolite CFL;  $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a preostalih 6 sati svjetlosti niskog intenziteta ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), osim kod kraćih tretmana izlaganja. Tijekom pokusa prvo sam biljke izlagala visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 2.5, 5, 7.5, 10, 20 i 30 sati. U tim tretmanima nije bila vidljiva prilagodba biljaka na nove svjetlosne uvjete pa sam produžila mjerenje na 50 i 100 sati. Nakraju sam uzela i obradila podatke od listova biljaka izloženih 5, 30, 50 i 100 sati jakom intenzitetu osvjetljenja. Prema duljini izlaganja visokom intenzitetu osvjetljenja, dala sam tretmanima istraživanih biljaka nazive: HL5 (HL - engl. high light = visoki intenzitet svjetlosti, a broj predstavlja ukupan broj sati izloženosti visokom intenzitetu svjetlosti), HL30, HL50 i HL100. Nakon uzorkovanja za analizu, tretmani HL5 i HL100 stavljeni su 7 dana na oporavak (u klima komori u uvjetima dugog dana bez izlaganja svjetlosti visokog intenziteta tijekom fotoperioda). Prema duljini prethodnog izlaganja visokom intenzitetu svjetla, tretmanima u kojima se pratio oporavak dala sam imena: O-5 (O - oporavak nakon 5 sati izlaganja visokom intenzitetu osvjetljenja) i O-100 (O - oporavak nakon 100 sati izlaganja visokom intenzitetu osvjetljenja). S obzirom da je izlaganje visokom intenzitetu svjetlosti povećavalo temperaturu bez obzira što su se biljke nalazile u komori s kontroliranim uvjetima tijekom pokusa sam mjerila temperaturu na razini biljke te je ona iznosila  $33 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Istraživanje je napravljeno i na kontrolnoj skupini biljaka (K) koje su rasle u identičnim uvjetima kao i istraživane biljke, osim što nisu izložene visokom intenzitetu svjetlosti.

Neposredno nakon uzorkovanja provela sam mjerenje fluorescencije klorofila *in vivo* koristeći najveće listiće. Preostale uzorkovane listiće pohranila sam na  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  za daljnje analize (količina fotosintetskih pigmenata, ukupnih fenola, antocijana, tanina te flavonoida).



### 3.2. METODE

Kao pokazatelje učinka visokog intenziteta svjetlosti mjerila sam fluorescenciju klorofila *a in vivo* te udio fotosintetskih pigmenata, ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i tanina.

#### 3.2.1. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo*

Fluorescenciju klorofila *a* mjerila sam pomoću fluorimetra „Qubit systems“ (Kanada) metodom saturacijskog pulsa koju su opisali Schreiber i sur. (1995). Pola sata prije mjerenja uzorkovane listove sam stavila u potpunu tamu. Listove prilagođene na uvjete tame sam potom položila na stalak fluorimetra, na filter papir prethodno navlažen destiliranom vodom (tako listić bolje prijanja uz stalak i ne osuši se tijekom mjerenja). Mjerenje sam započela obasjavanjem lista crvenom svjetlošću niskog intenziteta ( $1 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), koja je nedovoljna za pokretanje fotokemijske reakcije, te sam u tom koraku zabilježila minimalnu vrijednost fluorescencije u listu prilagođenom na uvjete tame ( $F_0$ ). Nakon toga primijenila sam saturacijski puls (kratkotrajnu svjetlost visokog intenziteta; oko  $3500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) što je rezultiralo nastankom maksimalne vrijednosti fluorescenciju ( $F_m$ ). Nakon stabilizacije signala fluorescencije upalila sam aktinično svjetlo (bijela svjetlost;  $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) intenziteta dovoljnog za pokretanje fotokemijskih reakcija pri čemu se uočava porast vrijednosti fluorescencije. Nakon stabilizacije signala primjenjuju se saturacijski pulsevi u određenim intervalima. Kada se je mjerenje ustalilo zabilježila sam vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) i fluorescencije ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) u listu prilagođenom na uvjete svjetla. Na kraju sam ugasila aktinično svjetlo (pri čemu je listić i dalje osvijetljen crvenim svjetlom niskog intenziteta) što je dovelo do pada signala fluorescencije, te sam u tom koraku izmjerila  $F'_0$  (Vidaković - Cifrek i sur. 2013).

Fluorimetar je povezan s računalom na kojemu se pomoću računalnog programa Logger Pro 3.2 bilježe signali iz fluorimetra u obliku pikova u koordinatnom sustavu (na apscisi se prati vrijeme, a na ordinati signal fluorescencije). Obradom grafičkih prikaza dobila sam potrebne podatke ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F'_m$ ,  $F_s$  i  $F'_0$ ) za svaki uzorkovani listić. Iz dobivenih podataka sam u programu Microsoft Excel 2007 prema formulama 1, 2 i 3 (Maxwell i Johnson 2000) odredila maksimalnu učinkovitost PSII (optimalan prinos PSII), stopu prijenosa elektrona (ETR) i nefotokemijsko gašenje (NPQ).

**Optimalan prinos fluorescencije****(formula 1)**

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

**Stopa prijenosa elektrona****(formula 2)**

$$ETR = \Phi_{PSII} * PFD * 0,5 = (F'_m - F_s) / F'_m * PFD * 0,5$$

**Nefotokemijsko gašenje****(formula 3)**

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

$F_v$  - varijabilna fluorescencija =  $F_m - F_0$

$F_m$  - maksimalni prinos fluorescencije u listu prilagođenom na tamu

$F_0$  - minimalni prinos fluorescencije

$\Phi_{PSII}$  - efektivna učinkovitost PSII

$F'_m$  - maksimalni prinos fluorescencije u listu prilagođenom na svjetlo

$F_s$  - fluorescencije ravnotežnog stanja

PFD - vrijednost gustoće fotona

### 3.2.2. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje fotosintetskih pigmenata

U klimatiziranoj prostoriji na ohlađeni uložak za prijenosni hladnjak stavila sam porculanski tarionik (prethodno ohlađen u hladnjaku na 4 °C). Pomoću ohlađenog tučka u tarioniku sam homogenirala 15 - 20 mg biljnog tkiva u 0,75 mL ohlađenog 100%-tnog acetona. Dobiveni homogenat prelila sam u označenu i ohlađenu plastičnu tubicu (na ledu). Tada sam u tarionik dodala još 0,75 mL 100%-tnog acetona radi ispiranja ostatka homogenata te ostatak nadolila u istu plastičnu tubicu. Dobiveni uzorak sam centrifugirala 10 min na 5000 g pri temperaturi od 4 °C. Supernatant sam prelila u čiste plastične tubice jednakih oznaka te nadopunila acetonom do oznake 1 mL jer se volumen supernatanta smanjio zbog hlapivosti acetona. Uzorke sam prelila u kivete i UV/VIS spektrofotometrom Specord (Analytik Jena) odredila vrijednosti apsorbancije na 3 valne duljine: 470 nm, 646 nm i 663 nm.

Maseni udio pigmenata u tkivu odredila sam prema formulama (Lichtenthaler 1987):

$$\text{a) Za klorofil } a: c_a = \frac{11,24 \times A_{663} - 2,04 \times A_{646}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$$\text{b) Za klorofil } b: c_b = \frac{20,13 \times A_{646} - 4,19 \times A_{636}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$$\text{c) Za karotenoide: } c_k = \frac{1000 \times A_{470} - 1,90 \times c_a - 63,14 \times c_b}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$c_a$  = udio pigmenta klorofila *a* (mg/g svježe tvari)

$c_b$  = udio pigmenta klorofila *b* (mg/g svježe tvari)

$c_k$  = udio pigmenta karotenoida (mg/g svježe tvari)

*A* = apsorbancije uzoraka pri određenim valnim duljinama

*V* = volumen uzorka (mL)

*l* = duljina optičkog puta = 1 cm

*m* = masa uzorka (g)

### **3.2.3. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana**

Unutar klimatizirane prostorije na ohlađeni uložak prijenosnog hladnjaka stavila sam porculanski tarionik koji se hladio u hladnjaku na 4 °C. U tarionik sam dodala 15 - 20 mg uzoraka (3 - 5 listića) i ohlađenim tučkom sam krenula s homogenacijom uzorka u 0,5 mL 50%-tnog metanola. Dobiveni homogenat prelila sam u označenu plastičnu tubicu koja se nalazila na ledu. Tada sam u tarionik dodala još 0,5 mL 50%-tnog metanola da isperem ostatke homogenata s tučka i tarionka, što sam također ulila u istu plastičnu tubicu. Uzorke sam inkubirala u termobloku 30 min pri temperaturi od 60 °C. Nakon hlađenja (2 min na ledu) uzorke sam centrifugirala 10 min na 12000 g pri temperaturi od 4 °C. Supernatant sam prelila u nove graduirane plastične tubice jednakih oznaka, te ih nadopunila metanolom do 1 mL. Ovako dobivene uzorke koristila sam za određivanje ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana u tkivu.

#### **3.2.3.1. Određivanje udjela ukupnih fenola u tkivu**

U plastičnu tubicu dodala sam 1,58 mL deH<sub>2</sub>O, 0,02 mL ekstrakta i 0,1 mL *Folin–Ciocalteu* reagensa (FC), te dobivenu smjesu kratko promiješala na vorteks mješalici. U smjesu sam zatim dodala 0,3 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,88 M) te ponovo kratko promiješala na vorteks mješalici. Nakon toga uzorke sam inkubirala u termobloku 60 min na temperaturi od 45 °C dok uzorci nisu poprimili plavu boju. Zatim sam uzorke prelila u kivete i izmjerila apsorbanciju na 765 nm. Za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 0,02 mL 50%-tnog metanola. Koncentraciju ukupnih fenola sam odredila koristeći baždarnu krivulju s poznatim koncentracijama galne kiseline (Singleton i sur. 1999). Maseni udio ukupnih fenola u tkivu izrazila sam u miligramima ekvivalenata galne kiseline po gramu svježe mase tkiva (mg E-GA g<sup>-1</sup><sub>sv.t.</sub>).

### 3.2.3.2. Određivanje udjela tanina u tkivu

Odvagala sam 0,01 g polivinilpolipirrolidona (PVPP) i stavila ga u plastičnu tubicu, dodala 0,1 mL vode i 0,1 mL ekstrakta te kratko promiješala na vorteks mješalici kako bi se PVPP otopio. Smjesu sam inkubirala 1 sat pri sobnoj temperaturi (24 °C) te zatim centrifugirala na 15 000 g u trajanju od 10 min. Dobiveni supernatant prelila sam u čiste plastične tubice te koristila dalje za određivanje tanina.

U novu plastičnu tubicu od 2 mL dodala sam 1,54 mL deH<sub>2</sub>O, 0,06 mL ekstrakta iz prethodnog koraka (ekstrakt bez tanina) i 0,1 mL FC reagensa. Nakon kratkog miješanja na vorteks mješalici u smjesu sam dodala još 0,3 mL 1,88 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> te smjesu ponovno kratko promiješala. Nakon toga uzorke sam inkubirala u termobloku 60 min na temperaturi od 45 °C dok uzorci nisu lagano poprimili plavu boju. Zatim sam uzorke prelila u kivete i izmjerila apsorbanciju na 765 nm na kojoj se mjere i ukupni fenoli. Iz ovog mjerenja sam odredila udio slobodnih fenola (većinom fenolnih kiselina) bez tanina. Udio tanina sam odredila tako što sam od udjela ukupnih fenola oduzela udio slobodnih fenola. Rezultate sam izrazila u miligramima tanina po gramu svježe mase tkiva (mg tanina g<sup>-1</sup><sub>sv.t.</sub>).

### 3.2.3.3. Određivanje udjela flavonoida u tkivu

U plastične tubice dodala sam 0,1 mL ekstrakta, 0,02 mL 10%-tne otopine aluminijeva klorida, 0,5 mL 1 M kalijevog acetata i 0,38 mL H<sub>2</sub>O. Svaki uzorak sam promiješala na vorteks mješalici i inkubirala uzorke 30 min na sobnoj temperaturi (24 °C). Uzorke sam prelila u kivete i izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 420 nm. Za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 0,1 mL 50%-tnog metanola (Pourmorad i sur. 2006). Koncentraciju flavonoida u svakom uzorku izračunala sam na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza otopina kvercetina poznatih koncentracija (0,025 – 0,1 mg mL<sup>-1</sup>). Rezultate sam izrazila u miligramima ekvivalenata kvercetina po gramu svježe mase tkiva (mg E-K g<sup>-1</sup><sub>sv.t.</sub>).

#### 3.2.3.4. Određivanje udjela antocijana u tkivu

U 0,5 mL ekstrakta dodala sam 0,5 mL 50%-tnog metanola i 84  $\mu$ L 37%-tne klorovodične kiseline (HCl). Ovako priređenu smjesu inkubirala sam u termobloku 30 min pri temperaturi od 60 °C. Nakon hlađenja (2 min na ledu) smjesu sam ulila u kivete i izmjerila apsorbanciju pri 537 nm pomoću UV/VIS spektrofotmetra. za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 0,5 mL 50%-tnog metanola (Paiva i sur. 2003). Koncentraciju antocijana odredila sam koristeći ekstinkcijski koeficijent cijanidin-3-glukozida  $\epsilon = 26900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Lee i sur. 2008) i molekularnu masu (484,8  $\text{g mol}^{-1}$ ), a dobivene rezultate izrazila u miligramima ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po gramu svježe mase tkiva ( $\text{mg E-C3G g}^{-1}_{\text{sv.t.}}$ )

#### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Rezultate sam prikazala kao srednje vrijednosti od 6 nezavisnih replika  $\pm$  standardna pogreška, osim ako nije drugačije navedeno. Pri obradi podataka koristila sam računalni program Microsoft Excel 2007. Usporedba dobivenih rezultata provedena je analizom varijance (one - way ANOVA), te Tuckey HSD testom pomoću računalnog programa STATISTICA 7.1 (StatSoft Inc., SAD). Statistički značajnim podacima smatrala sam one rezultate koji se razlikuju na razini  $p \leq 0,05$ .

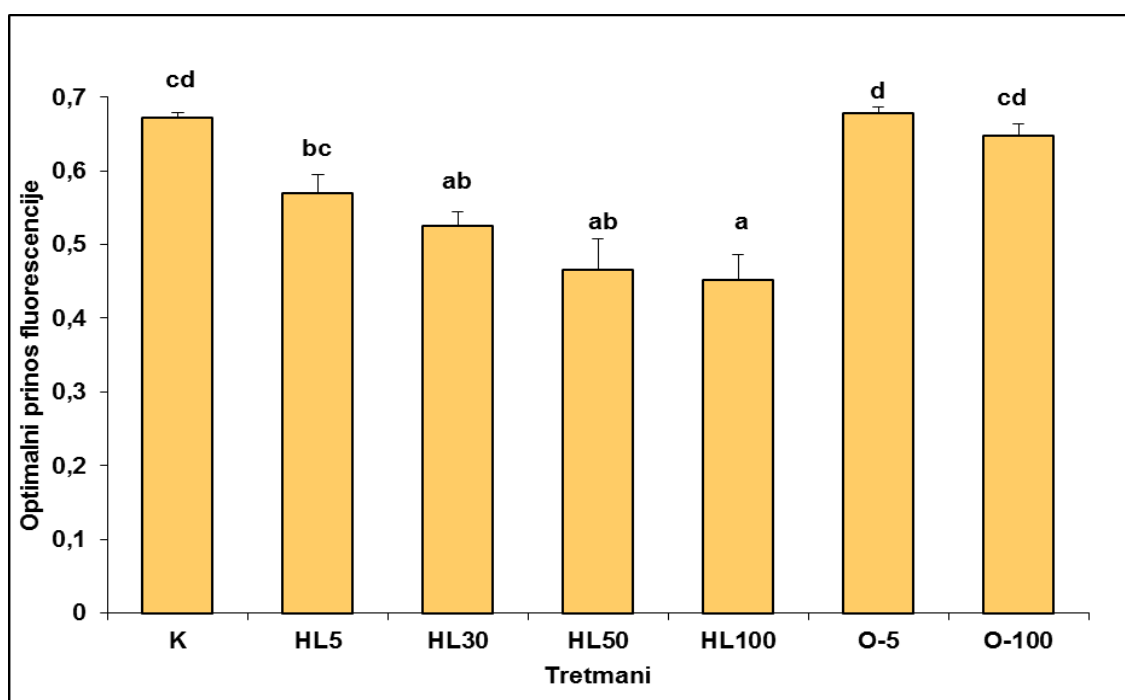
#### 4. REZULTATI

Duljina izlaganja biljaka visokom intenzitetu svjetlosti iznosila je 5 (tretman HL5), 30 (tretman HL30), 50 (tretman HL50) i 100 (tretman HL100) sati. Tijekom izlaganja biljke su bile izložene 10 sati svjetlosti vrlo visokog intenziteta ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a preostalih 6 sati svjetlosti niskog intenziteta ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), osim kod najkraćeg izlaganja od 5 sati. Nakon završetka izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti, tretmani HL5 i HL100 stavljeni su 7 dana na oporavak u klima komoru u uvjete niskog intenziteta svjetlosti i dugog dana. U identičnim uvjetima niskog intenziteta svjetlosti i dugog dana rasle su rosike koje su predstavljale kontrolnu grupu. Kao pokazatelje učinka visokog intenziteta svjetlosti prvo sam mjerila fluorescenciju klorofila *a in vivo* metodom saturacijskog pulsa te na temelju dobivenih podataka odredila sam maksimalnu učinkovitost PSII (optimalan prinos PSII), stopu prijenosa elektrona i nefotokemijsko gašenje. Nakon toga sam u ekstraktima listova pomoću spektrofotometra odredila vrijednosti apsorbancije te izračunala maseni udio fotosintetskih pigmenata, ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i tanina u tkivu.

#### 4.1. Utjecaj visokog intenziteta zračenja na fluorescenciju klorofila *a* *in vivo*

##### 4.1.1. Optimalni prinos fluorescencije

Nakon 5, 30, 50 i 100 sati izlaganja rosika visokom intenzitetu svjetlosti vidljiv je postepeni pad optimalnog prinosa u odnosu na kontrolne biljke. Nakon 5 sati izlaganja svjetlosnom stresu pad vrijednosti nije bio statistički značajan dok su dulja izlaganja dovela do značajnog smanjenja optimalnog prinosa. Najmanje vrijednosti uočila sam u tretmanima HL50 i HL100 u kojem su rosike bile izložene visokom intenzitetu svjetlosti tijekom ukupno 50 i 100 sati. Međutim vrijednosti izmjerene za ta dva tretmana nisu se značajno razlikovala od one za tretman HL30. Nakon oporavka u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti vrijednost optimalnog prinosa značajno je porasla te dostigla vrijednosti izmjerene kod kontrolnih biljaka (Slika 6).

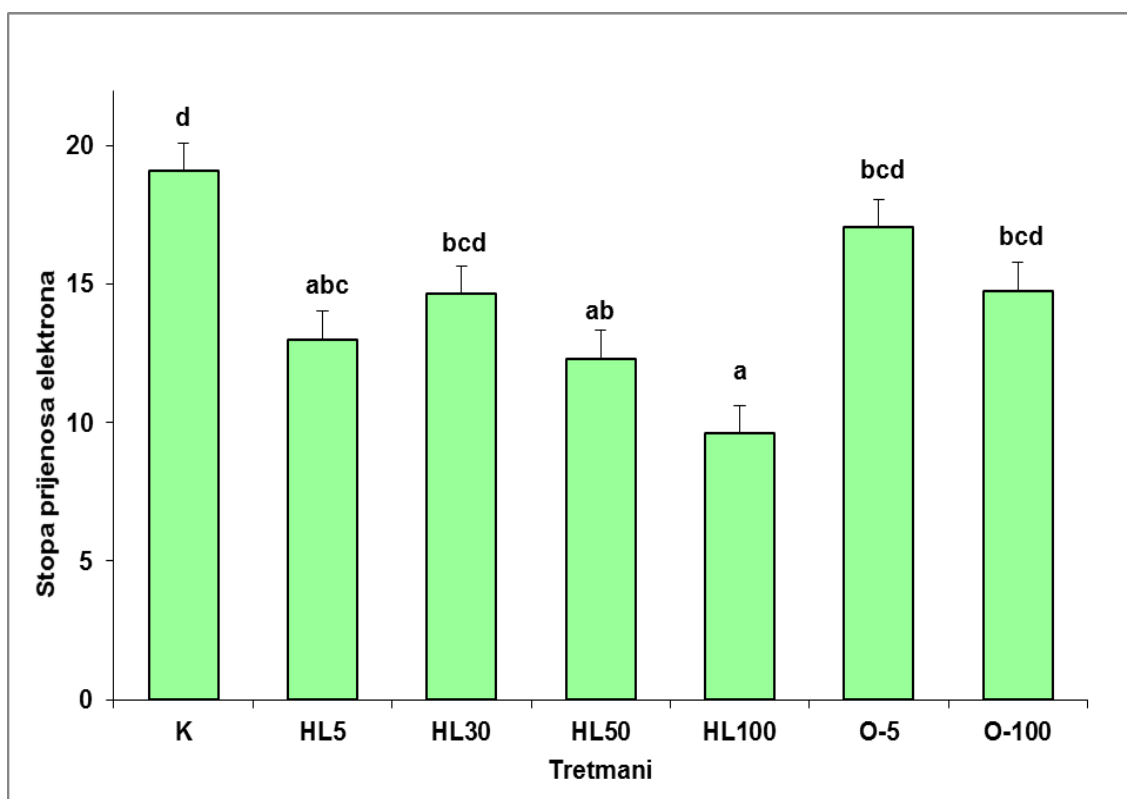


**Slika 6.** Optimalni prinos fluorescencije u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).



#### 4.1.2. Stopa prijenosa elektrona

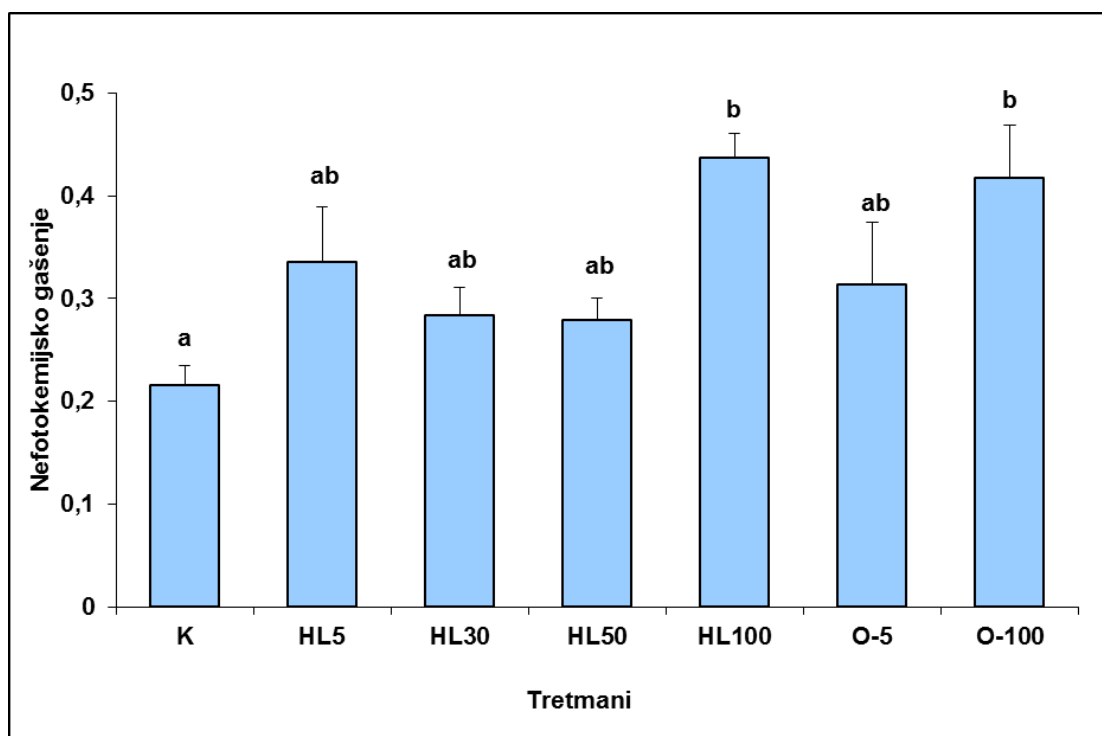
Nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti u većini tretmana uočeno je značajno smanjenje stope prijenosa elektrona u odnosu na kontrolne biljke. Najmanja vrijednost prijenosa elektrona bila je u rosika koje su izlagane visokom intenzitetu svjetlosti u ukupnom trajanju od 100 sati (Slika 7). Kod tretmana HL30 vrijednost se nije statistički značajno razlikovala od kontrolne vrijednosti. Nakon oporavka u oba tretmana (O-5 i O-100) uočen je porast prijenosa elektrona, pri čemu su dostignute vrijednosti bliske onima u kontrolnih biljaka.



**Slika 7.** Stopa prijenosa elektrona u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije

Izlaganje biljaka visokom intenzitetu svjetla povisilo je vrijednost nefotokemijskog gašenja u svim promatranim tretmanima, no statistički značajan porast zabilježen je u tretmanu gdje je rosika izlagana visokom intenzitetu svijetlosti u ukupnom trajanju od 100 sati (HL100) i kod njenog oporavka. Kod sedmodnevnog oporavka tretmana od 5 sati (O-5) vrijednost nefotokemijskog gašenja je povišena u usporedbi sa kontrolnom grupom ali nije statistički značajna (Slika 8).

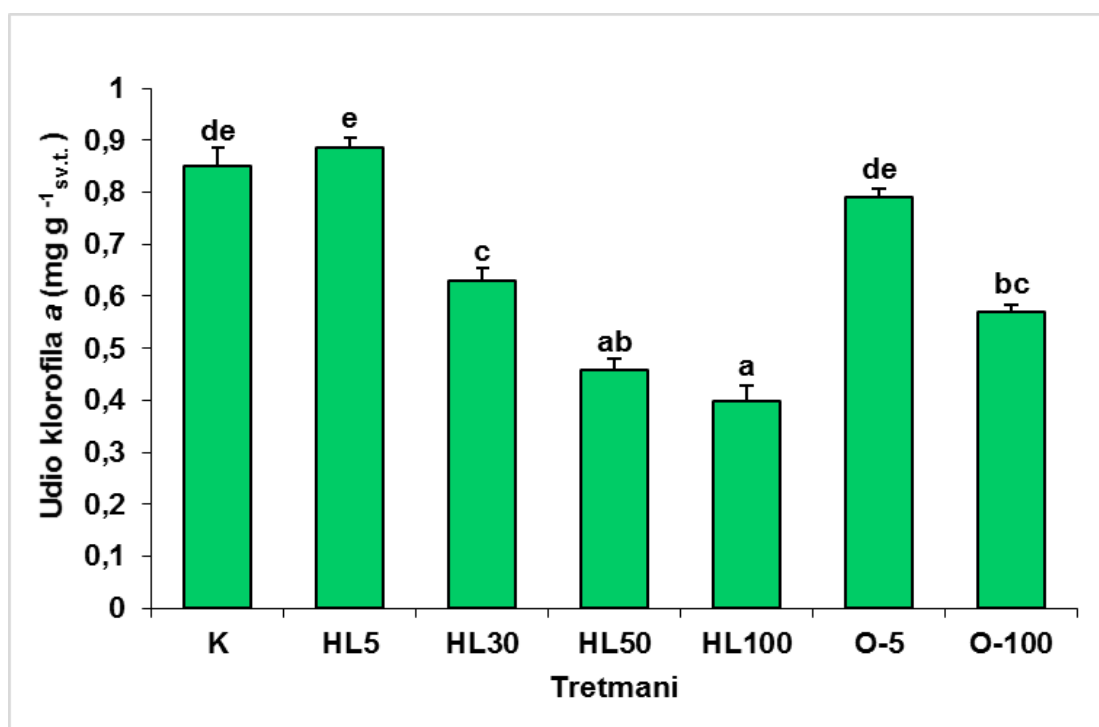


**Slika 8.** Nefotokemijsko gašenje u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

## 4.2. Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na fotosintetske pigmente

### 4.2.1. Udio klorofila *a* u tkivu

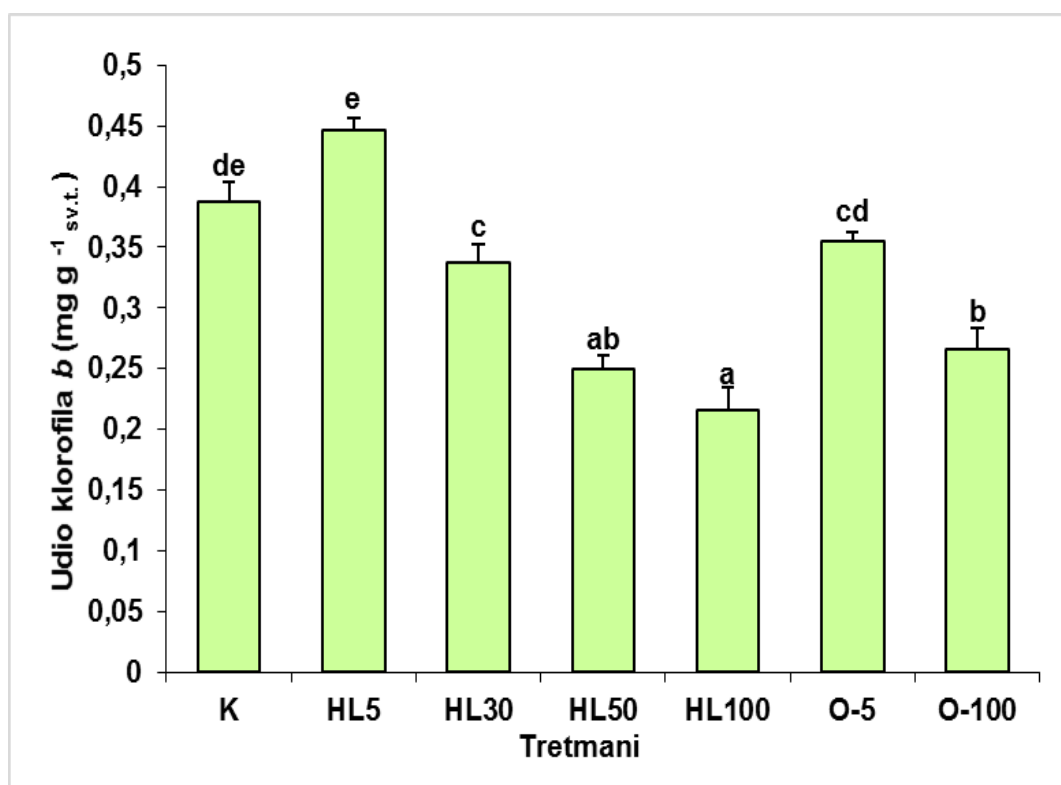
Izlaganje biljaka visokom intenzitetu svjetla u trajanju od 5 sati nije utjecalo na udio klorofila *a* u odnosu na kontrolne biljke. Nakon izlaganja biljaka visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 30, 50 i 100 sati vidljiv je statistički značajan pad udjela klorofila *a* u tkivu. Usporedbom tretmana HL5 i O-5 nije vidljiva promjena udjela klorofila *a*. Usporedba tretmana HL100 i O-100 pokazala je značajan porast vrijednosti udjela klorofila *a* nakon oporavka. No, svejedno je vrijednost udjela klorofila *a* u tretmanu O-100 ostala statistički značajno niža u odnosu na kontrolne biljke (Slika 9).



**Slika 9.** Udio klorofila *a* u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2. Udio klorofila *b* u tkivu

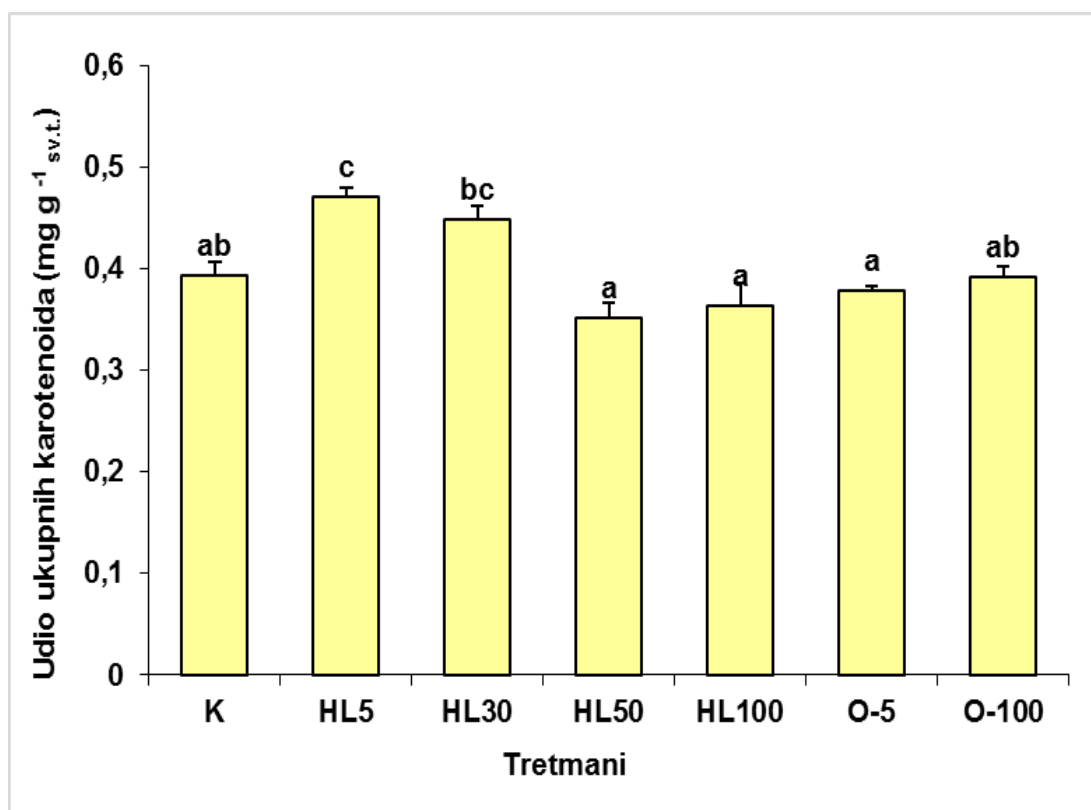
Izlaganje biljaka visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 5 sati dovelo je do laganog povišenja udjela klorofila *b* u odnosu na kontrolnu grupu, ali to nije bilo statistički značajno. Dulje izlaganje biljaka visokom intenzitetu svjetlosti uzrokovalo je statistički značajan pad udjela klorofila *b* pa je tako u biljkama izloženim svjetlosnom stresu u trajanju od 50 i 100 sati izmjeren najniži udio klorofila *b*. Usporedba tretmana HL5 i O-5 pokazala je da je u biljaka nakon oporavka u odnosu na biljke izložene svjetlosnom stresu došlo do sniženja udjela klorofila *b* na razinu kontrolnih biljaka. Iako je O-100 pokazao statistički značajan porast udjela klorofila *b* u odnosu na tretman HL100, on je i dalje ostao snižen u odnosu na kontrolne biljke (Slika 10).



**Slika 10.** Udio klorofila *b* u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.2.3. Udio ukupnih karotenoida u tkivu

Nakon 5 sati izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti uslijedio je značajan porast udjela ukupnih karotenoida. Daljnje izlaganje biljaka visokom intenzitetu svjetla, osobito u trajanju od 50 i 100 sati uzrokovalo je vraćanje vrijednosti udjela ukupnih karotenoida na vrijednost izmjerenu u kontrolnim biljkama. Vrijednosti slične kontrolnoj zabilježene su i u biljkama nakon oporavka odnosno O-5 i O-100 (Slika 11).



**Slika 11.** Udio ukupnih karotenoida u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.4. Omjeri klorofila *a* i *b* te karotenoida i ukupnih klorofila

Omjer klorofila *a* i *b* se smanjuje izlaganjem visokom intenzitetu svjetlosti u tretmanima HL 5, HL30, HL 50 i HL 100. Svi tretmani osim HL5 su statički značajno manji od kontrolne grupe. Usporedbom oba tretmana prije i nakon sedmodnevnog oporavka (O-100 i O-5) omjeri su porasli na vrijednost sličnu onoj kontrolne grupe ali nisu bili statistički značajno različiti od kontrolne grupe (Tablica 1).

U tretmanima HL 30, HL 50 i HL 100 omjeri karotenoida i ukupnih klorofila su statistički značajno veći od kontrolne grupe, dok tretmani međusobno nisu statistički značajno različiti. Kod oporavka u oba tretmana, O-100 i O-5, vrijednosti su se smanjile, ali se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na sam tretman, dok je O-100 bio statistički značajno veći od kontrolne grupe (Tablica 1).

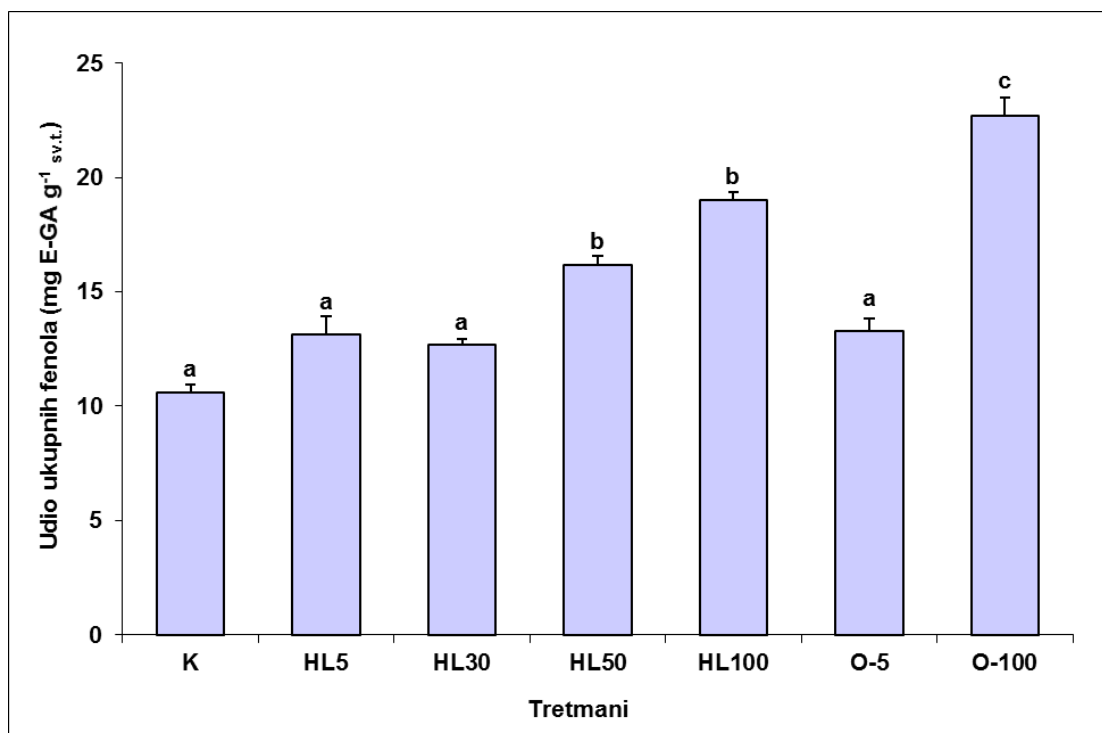
**Tablica 1.** Omjeri klorofila *a* i *b* te karotenoida i ukupnih klorofila u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnuti oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Vrijednosti označene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

TRETMANI	Omjer klorofila <i>a</i> i <i>b</i>	Omjer karotenoida i ukupnih klorofila
K	2,198 + 0,0252 <sup>bc</sup>	0,317 + 0,0044 <sup>a</sup>
HL5	1,984 + 0,0087 <sup>ab</sup>	0,352 + 0,0032 <sup>a</sup>
HL30	1,874 + 0,0264 <sup>a</sup>	0,464 + 0,0147 <sup>b</sup>
HL50	1,832 + 0,0319 <sup>a</sup>	0,497 + 0,0091 <sup>b</sup>
HL100	1,860 + 0,0542 <sup>a</sup>	0,595 + 0,0201 <sup>b</sup>
O-5	2,229 + 0,0126 <sup>c</sup>	0,330 + 0,0054 <sup>a</sup>
O-100	2,169 + 0,1054 <sup>bc</sup>	0,470 + 0,0149 <sup>b</sup>

### 4.3. Utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na fenolne spojeve

#### 4.3.1. Udio ukupnih fenola u tkivu

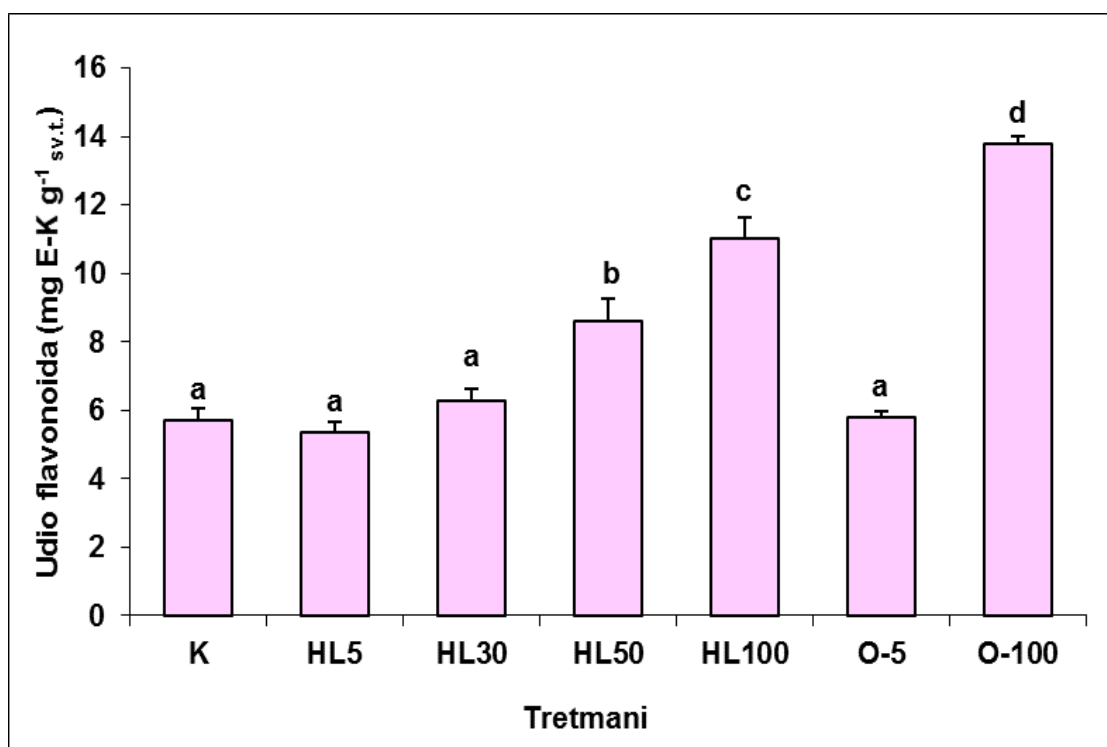
U svih uzorcima rosike izloženih visokom intenzitetu svjetlosti uočeno je povećanje udjela ukupnih fenola u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je statistički značajan porast uočen samo u tretmanima HL50 i HL100. Nakon 5 sati izlaganja rosika visokom intenzitetu svjetlosti nije došlo do značajnijeg porasta udjela ukupnih fenola te je udio ostao nepromijenjen i nakon sedmodnevnog oporavka u uvjetima niskog intenziteta osvjetljenja. Zanimljiv je tretman HL100 u kojem je nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti izmjerena najveći udio fenola, a nakon oporavka u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti udio se još povećao i to značajno i u odnosu na kontrolne biljke i u odnosu na vrijednost izmjerenu kod tretmana HL100 (Slika 12).



**Slika 12.** Udio ukupnih fenola u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2. Udio flavonoida u tkivu

Udio flavonoida u rosikama koje su bile izložene visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 5 i 30 sati nije se značajnije promijenio u odnosu na kontrolne biljke. Udio je ostao nepromijenjen i u tretmanu O-5 nakon sedmodnevnog oporavka u uvjetima niskog intenziteta osvjetljenja. Za razliku od njih, izlaganje visokom intenzitetu osvjetljenja u trajanju od 50 i 100 sati značajno je povisilo udio flavonoida (Slika 13). I ovdje je, slično kao i kod ukupnih fenola, uočeno da je udio flavonoida najviše porastao nakon tretmana HL100, te da je nakon oporavka udio flavonoida bio značajnije veći čak i u odnosu na sam tretman.

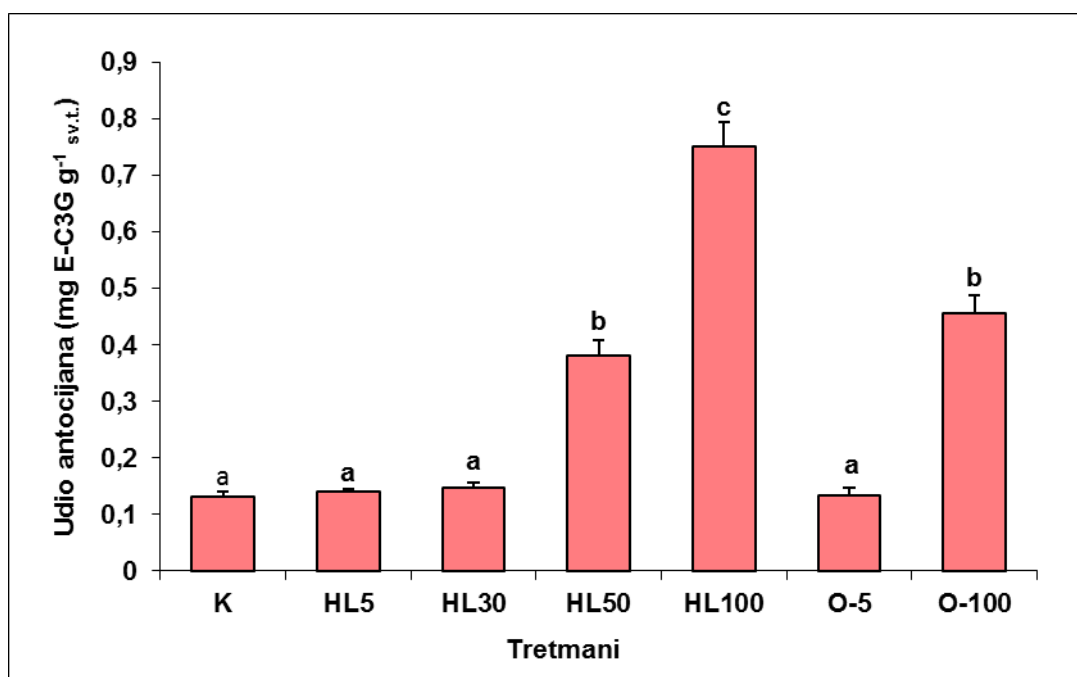


**Slika 13.** Udio flavonoida u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).



#### 4.3.4. Udio antocijana u tkivu

Udio antocijana u rosikama koje su bile izložene visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 5 i 30 sati nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolne biljke. Izlaganje visokom intenzitetu svjetlosti u ukupnom trajanju od 50 i 100 sati rezultiralo je znatnim povećanjem udjela antocijana, posebice u biljaka nakon 100 sati izlaganja gdje je udio antocijana porastao za 5,4 puta, a kod 50 sati je porastao 2,7 puta nasuprot kontrolne grupe. Slično kao ni HL5 tretman, tako ni oporavak O-5 nisu značajno utjecali na udio antocijana u biljnom tkivu. U tretmanu HL100 u kojem je uočen najveći porast udjela antocijana, sedmodnevni oporavak u uvjetima niskog intenziteta osvjetljenja snizio je udio antocijana, no čak i nakon oporavka udio je antocijana i dalje ostao značajno povišen u odnosu na kontrolne biljke za 3,2 puta (Slika 14).



**Slika 14.** Udio antocijana u kontrolnim biljkama (K), biljkama nakon 5 (HL5), 30 (HL30), 50 (HL50) i 100 (HL100) sati izloženosti vrlo visokom intenzitetu svjetlosti ( $700 \pm 20 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) te u biljkama koje su nakon 5 (O-5) i 100 (O-100) sati izlaganja visokom intenzitetu svjetla podvrgnute oporavku u trajanju od 7 dana u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

U Hrvatskoj, okruglolisna rosika (*Drosera rotundifolia* L.) raste na specifičnom močvarnom staništu (cret) koji polako nestaje zbog zarašćivanja (sukcesije). Iako su rosike heliofilne biljke i prilagođene rastu na otvorenim sunčanim staništima (Ellison i Gotelli 2001), mogu podnijeti i rast u zasjenjenim uvjetima (Hájek i Adamec 2010). Međutim postoji ideja da se zaraštena cretna staništa obnavljaju košnjom visoke vegetacije što bi onda dovelo do naglog izlaganja rosika višim intenzitetima svjetlosti. Kako je okruglolisna rosika jedna od kritično ugroženih i zaštićenih biljnih vrsta kojoj u Hrvatskoj prijeti nestajanje, ovo je istraživanje napravljeno da se ustvrdi može li se nakon uklanjanja vegetacije rosika prilagoditi na visoki intenzitet svjetlosti. U istraživanju sam biljke izlagala visokom intenzitetu svjetlosti u različitim vremenskim intervalima (5, 30, 50 i 100 sati) i usporedila rezultate s kontrolnom grupom biljaka koje su rasle u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti što bi predstavljalo biljke koje žive u sjeni visoke vegetacije. Također promatrala sam i što se zbiva s biljkama koje sam nakon izlaganja visokom intenzitetu osvjettljenja stavila na „oporavak“ u uvjete niskog intenziteta svjetlosti.

U biljaka koje su izložene intenzitetu svjetlosti višem od točke svjetlosnog zasićenja fotosinteze pojavljuje se svjetlosni stres na koji biljke reagiraju promjenom koncentracije i sastava fotosintetskih pigmenata (Walters 2005), te povećanjem koncentracije fenolnih spojeva kao što su flavonoidi, antocijani, fenolne kiseline i tanini (Close i McArtur 2002). Ove promjene dovode do prilagodbe fotosintetskog aparata čime utječu na sam proces i učinkovitost fotosinteze (Walters 2005).

Kako bih odredila učinak izloženosti visokim intenzitetima svjetlosti na fotosintetski aparat i fenolne spojeve u rosiki te dolazi li vremenom do aklimatizacije na nove svjetlosne uvjete neposredno nakon izlaganja, izmjerila sam fluorescenciju klorofila *a in vivo* te pomoću spektrofotometra odredila sadržaj fotosintetskih pigmenata, ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i tanina u listovima tretiranih i kontrolnih biljaka.

## 5.1. Učinak visokog intenziteta osvjetljenja na fotosintezu okruglolisne rosike

U optimalnim uvjetima u listovima se samo 50% apsorbirane svjetlosti koristi za razne svjetlosne procese. Biljke izložene visokom intenzitetu svjetlosti apsorbiraju više svjetlosti nego što je potrebno te može doći do fotoinhibicije i oštećenja fotosintetskog aparata. Najosjetljiviji dio fotosintetskog aparata je PSII jer se lako ošteti viškom svjetlosti. Metoda fluorescencije klorofila *a in vivo* nam govori upravo o učinkovitosti PSII, a time i o samom procesu fotosinteze. Promjene učinkovitosti fotosinteze su vidljive na razini vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F_m$ ). Kod rosike vrijednost  $F_m$  je u kontrolnim biljkama iznosila 0,7 dok je kod ostalih tretmana je iznosila 0,5 do 0,7. Smanjenje  $F_m$  vrijednosti ukazuje da su biljke pod stresom uzrokovanim visokim intenzitetom svjetlosti što je moglo utjecati na smanjenje stope fotosinteze i moguću fotoinhibiciju (Maxwell i Johnson 2000). U svom radu sam prikazala rezultate optimalnog prinosa fluorescencije jer je taj parametar najčešće korišteni indikator stresa u biljkama i govori o učinkovitost fotosinteze. U optimalnim uvjetima ta vrijednost iznosi oko 0,8, a do smanjenja dolazi uslijed fotoinhibicije (Maxwell i Johnson 2000). U ovom istraživanju vrijednost optimalnog prinosa izmjerena u kontroli bila je manja od teorijske vrijednosti i iznosila je 0,68. Niska vrijednost optimalnog prinosa je vjerojatno posljedica toga što mesojedne biljke imaju nižu stopu fotosinteze zbog prilagodbe listova na lov i apsorpciju tvari iz kukca (Bruzzese i sur. 2010). Drugi mogući razlog tako niske vrijednosti je da tijekom mjerenja nisam skidala tentakule s listova te su utjecali na mjerene rezultate. U odnosu na kontrolne biljke koje su rasle u uvjetima niskog intenziteta osvjetljenja, optimalni prinos je bio statistički značajno smanjen nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 30, 50 i 100 sati, dok se tretmani međusobno nisu statistički značajno razlikovali. Smanjenje optimalnog prinosa ukazuje na moguću fotoinhibiciju uslijed zatvaranja reakcijskih centara PSI i PSII i nakupljanja viška elektrona (Lichenthaler i Bukart 1999). Na reakcijskim centrima fotosistema plastokinoni reguliraju nakupljanje elektrona. Ako su plastokinoni oksidirani nije moguć prijenos elektrona između fotosistema I i II te elektroni mogu „pobjeći“ te reagirati s kisikom pri čemu nastaje singletni kisik koji oštećuje fotosintetski aparat i uzrokuje oksidacijski stres. Oksidacijsko - reduksijsko stanje plastokinona regulira optimalni prinos (Miyake i sur. 2009). Ako se smanji vrijednost optimalnog prinosa, a istovremeno poveća sadržaj antioksidanata poput karotenoida i fenolnih spojeva to ukazuje na njihovu moguću ulogu u zaštiti biljke i uklanjanju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Grace i Logan 2000). Slično se dogodilo u ovom istraživanju gdje sam u biljkama izloženim svjetlosnom stresu

izmjerila povećani udio karotenoida, ukupnih fenola, flavonoida i antocijana. Biljke iz tretmana 5 i 100 sati koje sam stavila na oporavak od sedam dana pokazale su porast vrijednosti optimalnog prinosa na vrijednost sličnu onoj izmjerenoj u kontrolnoj grupi što ukazuje da je u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti došlo do oporavka fotosintetskog aparata.

Osim optimalnog prinosa prikazala sam i rezultate stope prijenosa elektrona (ETR), parametra koji govori o tome koliko se svjetla apsorbiranog na PSII iskoristilo za fotokemiju odnosno rezultiralo prijenosom elektrona u transportnom lancu. Na temelju tog parametra možemo zaključivati o ukupnoj efikasnosti fotosinteze *in vivo* (Maxwell i Johnson 2000). Podatke o fotokemijskom gašenju, parametru koji kao i ETR govori o tome koliko se fluorescencija smanjila zbog učinkovitog prijenosa elektrona, ali na temelju udjela otvorenih PSII centara, nisam prikazala u rezultatima jer su odnosi vrijednosti između tretmana bili slični onima kod ETR-a. Dakle istraživanje je pokazalo da je ETR statistički značajno smanjen pri izlaganju visokom intenzitetu svjetlosti u trajanju od 5, 50 i 100 sati u odnosu na kontrolnu grupu, dok one nisu međusobno statistički značajno različite. Dobiveni rezultati me nisu iznenadili jer su kontrolne biljke rasle u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti pri čemu se fotosintetski aparat prilagodio maksimalnom iskorištenju raspoložive svjetlosti s više klorofila, a manje zaštitnih karotenoida u tilakoidnim membranama. S druge strane, obzirom da ne raspoložu s puno energije takve biljke ne ulažu u sintezu komponenata potrebnih za prijenos elektrona niti u sintezu enzima Calvinovog ciklusa, npr. enzima RuBisCo. Izlaganjem višim intenzitetima svjetlosti dolazi do preopterećenja fotosintetskog aparata koji ne može svu primljenu energiju iskoristiti za prijenos elektrona i sintezu šećera i ATP-a nego se prijenos elektrona blokira što dovodi do fotoinhibicije (Lichtenthaler i Burkart 1999; Miyake i sur. 2009). Kod biljaka koje su nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetla vraćene na oporavak, vrijednosti ETR-a počele su rasti jer biljka više nije bila izložena prevelikoj količini svjetlosne energije koja bi dovela do preopterećenosti sustava. Obzirom da u biljaka nisu uočene klorotične i nekrotične promjene, proizlazi da je fotoinhibicija bila reverzibilna ili su se moguća oštećenja uspješno popravila. Smanjenje ETR-a može se javiti i kod povišene vrijednosti antocijana (Karageorgou i Manetas 2006). Antocijani imaju više uloga u zaštiti biljaka, jedna od njih je antioksidacijska uloga kojom štite biljku od ROS i od oštećenja koja mogu uzrokovati (Gould i sur. 2010). U mojem eksperimentu smanjila se vrijednost ETR-a i povišio udio antocijana tek nakon 50 sati izlaganja. To ukazuje da se kod dužeg izlaganja višem intenzitetu svjetlosti javlja fotoinhibicija, koja uzrokuje stvaranje ROS-a, što biljku potiče na sintezu antocijana za njihovo uklanjanje.

Smatra se da je nefotokemijsko gašenje jedan od glavnih načina zaštite od fotoinhibicije jer sprječava da višak energije dođe do reakcijskih središta i ošteti ih (Müller i sur. 2001). U ovom eksperimentu vrijednost NPQ postepeno je rasla u svim tretmanima, no najviša vrijednost zabilježena je pri tretmanu HL100. Razlog povećanja vrijednosti NPQ je smanjenje učinkovitosti fotosinteze zbog zasićenja fotosintetskog aparata pa se suvišna apsorbirana energija oslobađa u obliku topline (Lichenthaler i Bukart 1999). Povećanje vrijednosti NPQ posljedica je konverzije vrste karotenoida iz ksantofilskog ciklusa, violaksantina u zeaksantin, pri čemu se oslobađa višak energije u obliku topline (Maxwell i Johnson 2000; Garcia – Plazaola i sur. 2002). Dobiveni rezultati upućuju da rosike pri kraćem izlaganju visokim intenzitetima svjetlosti reagiraju upravo aktivacijom mehanizama uključenim u NPQ koji dovode do oslobađanja viška ekscitacijske energije.

Usporedbom svih parametara fluorescencije klorofila koje sam mjerila vidljivo je da je kod biljaka izlaganih visokom intenzitetu svjetlosti došlo do postepenog pada vrijednosti optimalnog prinosa, ETR-a i fotokemijskog gašenja te porasta NPQ u odnosu na kontrolne biljke. Najveći pad optimalnog prinosa, ETR-a i fotokemijskog gašenja zabilježen je u tretmanu od 100 sati, gdje je ujedno zabilježen i najveći porast NPQ. U biljaka nakon oporavka vrijednost optimalnog prinosa i ETR-a su porasle, a vrijednost NPQ se smanjila i bila je slične vrijednosti kao kontrolna grupa. Smanjenje optimalnog prinosa i fotokemijskog gašenja te porast NPQ su pokazatelji fotoinhibicije (Lichenthaler i Burkart 1999) pa prema tome mogu zaključiti da je kod rosika izloženih visokom intenzitetu svjetla došlo do fotoinhibicije i promjene na fotosintetskom aparatu, da je transport elektrona djelomično blokiran što uzrokuje smanjenje prijenosa elektrona i stope fotosinteze (Lichenthaler i Bukart 1999) pri čemu ksantofilski ciklus pomaže u rasipanju svjetlosti i topline što smanjuje preopterećenost fotosintetskog aparata (Miyake i sur. 2009).

## 5.2. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na fotosintetske pigmente okruglolisne rosike

Pri povećanim intenzitetima svjetlosti, biljke smanjuju koncentraciju fotosintetskih pigmenata i mijenjaju njihov omjer (Walters 2005) jer suvišak apsorbirane energije može dovesti do nastanka reaktivnih oblika kisika (ROS) koji oštećuju fotosintetski aparat biljke (Sharma i sur. 2012).

U rosika izlaganih visokom intenzitetu svjetlosti udio klorofila *a* i *b* u tretmanima od 30, 50 i 100 sati značajno se je smanjilo u odnosu na kontrolnu grupu. Smanjenje udjela klorofila *a* i *b* ukazuje na brzu prilagodbu fotosintetskog aparata (Walters 2005). Kod prilagodbe fotosintetskog aparata smanjuje se veličina antena na PSII zbog čega se smanjuje količina energije koja dolazi na PSII te pruža neku vrstu zaštite od fotoinhibicije i fotooksidacije (Steyn i sur. 2002; Walters 2005). Manje vrijednosti klorofila *a* i *b* javljaju se kod jače transmisije visokog zračenja te se tumači kao smanjenje ekscitacijskog pritiska na PSII. Kako je poznato da fotoinhibicija može uzrokovati oštećenje fotosintetskih pigmenata (Franck i sur. 2007), ne iznenađuje da je u mojem istraživanju s povišenjem intenziteta osvjetljenja došlo do smanjenja sadržaja klorofila *a* i *b*. Smanjenje sadržaja klorofila odrazilo se je i kod vrijednosti omjera klorofila *a* i *b*. U sunčanom tipu listova vrijednosti omjera klorofila *a* i *b* kreću se u rasponu od 2,9 do 3,8, a u sjenovitom tipu listova od 2,3 do 2,8 (Lichenthaler 2007). U mojem istraživanju vrijednosti omjera klorofila *a* i *b* su bile manje od teorijskih i iznosile su 1,8 - 2,2. Poznato je da mesojedne biljke imaju nižu stopu fotosinteze zbog posebnih obilježja povezanih s karnivornosti tj. zamjene stanice s kloroplastima sa stanicama s probavnim žlijezdama, pri čemu sadrže malo klorofila i dušika u tkivu u odnosu na druge biljne vrste (Bruzese i sur. 2010). Zbog toga me nije iznenadila manja vrijednost omjera klorofila *a* i *b* od teorijske vrijednosti. U biljkama izloženim visokom intenzitetu osvjetljenja omjer se smanjivao porastom vremena izlaganja visokom intenzitetu, dok je nakon oporavka uočen porast. Same vrijednosti omjera upućuju da se listovi izloženi visokom intenzitetu svjetlosti ponašaju kao listovi sjene (Albert i sur. 2009), što nije bilo začuđujuće jer mesojedne biljke pri izlaganju listova visokom intenzitetu svjetlosti pokazuju obilježja skiofita, što ponovo ima veze sa njihovom karnivornosti (Bruzese i sur. 2010). Nakon oporavka od sedam dana omjer klorofila *a* i *b* se povećava na vrijednosti slične onima kod kontrolnih biljaka što je za očekivati jer su se biljke oporavljale u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti koje možemo usporediti s uvjetima sjene u kojima se koncentracija klorofila povećava (Walters 2005).

Karotenoidi su pomoćni fotosintetski pigmenti koji apsorbiraju višak energije koju nisu apsorbirali klorofili te taj višak pretvaraju u toplinu preko ksantofilog ciklusa da zaštite biljku od fotoinhibicije (Close i McArthur 2002). Također, štite biljku i od fotooksidacije jer su antioksidansi koji sprečavaju ili smanjuju nastajanje različitih oblika ROS-a (npr. tripletni klorofil i singletni kisik) te ih uklanjanju i tako sprječavaju oksidacijska oštećenja nastala viškom svjetlosti (Sharma i sur. 2012). Biljke izložene visokom intenzitetu svjetlosti imaju povećanu koncentraciju karotenoida kao i povećan udio karotenoida u odnosu na klorofile (Lichtenthaler 2007). U mom istraživanju, u tretmanima HL5 i HL30 vrijednosti karotenoida su povišene, dok su se u ostalim tretmanima smanjile uspoređujući ih s kontrolnom grupom. Udio karotenoida u tretmanima HL5 i HL30 je viši jer karotenoidi vjerojatno sudjeluju u zaštiti biljke od fotoinhibicije kod kraćih izlaganja visokom intenzitetu, preuzimanjem viška energije s klorofila i oslobađajući je u obliku topline, što potvrđuje i porast vrijednost NPQ parametra fluorescencije. Kod dužih izlaganja u tretmanima HL50 i HL100 udio karotenoida u tkivu nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolnu grupu, ali se smanjio u odnosu na tretmane HL5 i HL30. Vrijednosti karotenoida ne moraju značajno porasti da bi učinkovito štitile fotosintetski aparat od viška apsorbirane svjetlosti (Franck i sur. 2007), no smanjenje udjela karotenoida javlja se kada svjetlosni stres negativno utječe na prekursore za sintezu karotenoida ili kada višak apsorbirane svjetlosti oštećuje fotosintetske pigmente (Lichtenthaler 2007). Stoga smatram da je u mojem slučaju moglo doći i do oštećenja fotosintetskih pigmenata, što potvrđuju vrijednosti parametara fluorescencije koji ukazuju na fotoinhibiciju. Vrijednosti karotenoida u tretmanu 100 sati nakon oporavka počinje rasti na vrijednost kontrolne grupe te potvrđuje da je fotoinhibicija bila reverzibilna. U mojem istraživanju vrijednosti karotenoida su se odrazile na izračunate vrijednosti omjera karotenoida i ukupnih klorofila. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 3,1 do 5,9 te pokazuju da se koncentracija klorofila smanjila ili zbog oštećenja visokim intenzitetom svjetlosti ili kako bi se smanjila apsorpcija svjetlosti dok se koncentracija karotenoida nije značajnije promijenila kako bi karotenoidi mogli štititi fotosintetski aparat od oštećenja visokog intenziteta svjetlosti kod kraćeg izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti (Lichtenthaler 2007).

### 5.3. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na fenolne spojeve okruglolisne rosike

Fenolni spojevi su raznovrsni sekundarni metaboliti koji uključuju mnogobrojne skupine kemijskih spojeva poput flavonoida i tanina. Imaju najrazličitije uloge, od zaštite biljke od biljojeda (Sharma i sur. 2012), apsorpcije i zaštite od UV zračenja (Chalker – Scott 1999), do antioksidativne uloge u kojoj štite listove od fotooštećenja (Agati i Tattini 2010). U ovom istraživanju od posebnog su značaja svojstva fenola u zaštiti biljke od oštećenja visokim intenzitetom svjetlosti pri čemu se ponašaju kao antioksidanti koji uklanjaju svjetlosno inducirane ROS-ove (Close i McArthur 2002). U mojem istraživanju udio ukupnih fenola je povećan u svim tretmanima u odnosu na kontrolne biljke, no statistički najznačajniji je porast u tretmanima HL50 i HL100. Najveći udio fenola izmjereno je u tretmanu od 100 sati, koji je nastavio rasti i kod oporavka tog tretmana. Na povišenje udjela fenola utječe manjak minerala i visoki intenzitet zračenja koji mogu dovesti do stvaranja ROS-ova, zbog čega biljka stvara antioksidanse koji ih uklanjaju te tako sprječavaju daljnja oštećenja (Close i McArthur 2002). Moji rezultati su potvrdili pretpostavku da izlaganjem biljaka visokom intenzitetu osvjetljenja dolazi do povećanja udjela fenolnih spojeva. Tu pretpostavku je potvrdio i daljnji rast udjela fenola kod oporavka tretmana od 100 sati jer u tom tretmanu došlo je do jakog svjetlosnog stresa koji je inducirao sintezu fenolnih spojeva koja se nastavila odvijati i u uvjetima niskog intenziteta da ukloni nastale ROS-ove.

Tanini su vrsta fenolnih spojeva koji u biljkama imaju obrambenu ulogu u zaštiti od biljojeda, patogena i sl. Međutim neka istraživanja dokazuju da tanini imaju i jaku antioksidacijsku ulogu te da njihov udio može rasti u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti (Close i McArthur 2002) što sam potvrdila i u svojem istraživanju. Naime, udio tanina u tkivu se povećavao nakon izlaganja svjetlosnom stresu. Time je potvrđena gore navedena pretpostavka da se tanini povećavaju u uvjetima visokog intenziteta i da štite biljku od oštećenja koja nastaju od ROS-ova. Budući da su se rezultati dobiveni mjerenjem tanina gotovo identično poklapali s rezultatima dobivenim mjerenjem ukupnih fenola nisam ih prikazala u rezultatima. Rezultati podudaranja ne začuđuju jer se pokazalo da upravo tanini čine skoro 80% ukupnih fenola.

Flavonoidi imaju antioksidacijsku ulogu da štite biljke od fotooštećenja te kao i ostali fenolni spojevi štite biljke kod UV zračenja (Agati i Tattini 2010). Udio flavonoida povisuje se



kod UV zračenja i u uvjetima visokog intenziteta osvjetljenja bez prisustva UV zračenja (Jaakola i sur. 2004). To se pokazalo točno i u mojem istraživanju, gdje se kod dužih izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti (50 i 100 sati) značajno povisio udio flavonoida u odnosu na kontrolnu grupu te je rasla vrijednost i kod oporavka tretmana od 100 sati.

Antocijani su biljni pigmenti koji se nalaze u cvijeću, plodovima, stabljikama i listovima te ih oboje u cijeli niz boja od narančasto crvene do ljubičasto plave. Jedna od uloga antocijana je privlačenje kukaca oprašivača i rasprostranjivača sjemena, dok njihova uloga u vegetativnim organima još uvijek nije razjašnjena do kraja. Biljka proizvodi antocijane u stresnim situacijama poput visokog intenziteta svjetlosti, UV zračenja, niske temperature, ozljeda od biljojeda, nedostataka minerala itd. (Albert i sur. 2009). Biljke stvaraju antocijane i kod oksidacijskog stresa jer su antioksidanti koji uklanjaju ROS-ove (Close i Beadle 2003) te štite od fotoinhibicije kod visokih intenziteta svjetlosti tako da apsorbiraju višak svjetlosne energije u dubljim slojevima lista (Chalker - Scott 1999). Antocijani štite fotosintetska tkiva od fotoinhibicije jer apsorbiraju svjetlo plavog i zelenog dijela spektra te tako reduciraju količinu svjetlosti koja dolazi do kloroplasta (Steyn i sur. 2002, Merzlyak i sur. 2005). U ovom istraživanju udio antocijana znatno se povećao u tretmanima HL50 i HL100. Udio antocijana kod HL50 porastao je 2,7 puta, kod tretmana HL100 5,4 puta, naspram kontrolne grupe. U tretmanu HL100 u kojem je uočen najveći porast udjela antocijana, nakon sedmodnevnog oporavka u uvjetima niskog intenziteta osvjetljenja, snizio se udio antocijana, ali je i dalje ostao značajno povišen u odnosu na kontrolne biljke za 3,2 puta. Dakle biljke izložene visokom intenzitetu sunčeva zračenja u trajanju od 50 i 100 sati su značajno povećale koncentracije antocijana što se može povezati s ulogom antocijana u zaštiti biljaka od fotoinhibicije uslijed visokog zračenja. Kargeorgou i Manetas (2006) su potvrdili da nakupljeni antocijani imaju ulogu u zaštiti od fotoinhibicije ali samo kod starijih i debljih listova koji su bogati molekulama klorofila, dok Albert i suradnici (2009) tvrde da kod visokog intenziteta osvjetljenja raste koncentracija antocijana koja usmjerava svjetlost u listu i ne utječe na stopu fotosinteze.

Iz svih navedenih rezultata vidljivo je da su se rosike izlagane visokom intenzitetu svjetla počele prilagođavati na nastale uvjete. Kod fotosintetskih pigmenata smanjile su udio klorofila *a* i *b*, te značajno povećale udio karotenoida u odnosu na klorofile što ukazuje da biljke nisu povećale sintezu karotenoida nego su smanjile vrijednosti klorofila kako bi optimizirale količinu apsorbiranja energije i zaštitile se od fotoinhibicije. Osim toga inducirale su sintezu fenolnih spojeva, tanina, flavonoida i antocijana. Kod fluorescencije, vrijednosti optimalnog prinosa, stope fluorescencije i nefotokemijskog gašenja nakon sedmodnevnog oporavka su se

vratile na vrijednosti slične onima prije izlaganja, što ukazuje da je fotoinhibicija bila reverzibilna. Međutim vrijednosti optimalnog prinosa i ETR-a bile su niže tijekom izlaganja svjetlosnom stresu, što pokazuje da se biljke nisu stigle potpuno aklimatizirati, odnosno pokus nije trajao dovoljno dugo kako bi se vidjelo vraćanje optimalnog prinosa na kontrolnu razinu. Slično mjerenje na rosiki je radio i Doboš (2011) koji je jednu grupu biljka uzgajao u uvjetima niskog intenziteta osvjetljenja, a drugu izlagao prirodnom sučevom svjetlu. U tom pokusu biljke su se aklimatizirale tijekom izlaganja i došlo je do oporavka fotosintetske učinkovitosti. Međutim, u mojem istraživanju je period stresa bio duži i trajao je 10 sati tijekom dana, dok je kod Doboša trajao 5 sati zbog čega je možda aklimatizacija biljaka u mojem pokusu bila sporija. No moguće je da aklimatizaciji pridonosi i UV zračenje koje je sastavni dio prirodnog Sunčevog zračenja djelujući kao signal u aktivaciji zaštitinih mehanizama (Agati i Tattini 2010). Da je u mojem pokusu došlo do aklimatizacije potvrdile su i povišene vrijednosti fenolnih spojeva. Pretpostavljam da je razlog zašto u mojem istraživanju nije došlo do potpune aklimatizacije i oporavka fotosintetske učinkovitosti to što biljke nisam izlagala visokom intenzitetu svjetlosti dovoljno dugo vremena. Zanimljivo je da sam prvo biljke izlagala tretmanima 2,5, 5, 7,5, 10, 20 i 30 sati. U tim tretmanima se biljka nije uopće prilagodila pa sam produžila mjerenje na 50 i 100 sati, no ni to nije bilo dovoljno za potpunu aklimatizaciju. Za potpunu aklimatizaciju cijele biljke na visoki intenzitet svjetlosti potrebno je nekoliko tjedana do mjeseci (Walters 2005) nakon čega biljka stvara manje i deblje listove sa manjim udjelom kloroplasta koji imaju smanjeni potencijal za apsorpciju svjetlosti (Paiva i sur. 2003). Stoga predlažem da se napravi još jedno istraživanje s još dužim vremenskim tretmanima da se uvidi hoće li se biljke potpuno prilagoditi.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja na okruglolisnoj rosiki izloženoj visokom intenzitetu svjetlosti od  $700 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  u trajanju od 5, 30, 50 i 100 sati, te oporavka biljaka izloženih 5 i 100 sati mogu zaključiti sljedeće:

-vrijednosti optimalnog prinosa i stope prijenosa elektrona su se smanjile nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti, a porasla je vrijednost nefotokemijskog gašenja u odnosu na kontrolne biljke što ukazuje da je došlo do fotoinhibicije, ali i do oslobađanja suvišne energije u obliku topline što smanjuje preopterećenost fotosintetskog aparata. Međutim nakon sedmodnevnog oporavka vrijednosti su bile slične vrijednostima kontrolnih biljaka, što upućuje da fotoinhibicija nije bila ireverzibilna.

- udio klorofila *a* i *b* u tkivu te omjer klorofila *a* i *b* se smanjio nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti, a udio karotenoida i osobito omjer karotenoida i ukupnih klorofila je porastao, što može ukazivati na prilagodbu fotosintetskog aparata koji smanjivanjem koncentracije klorofila smanjuje primanje svjetlosne energije i preopterećenost sustava te istovremeno štiti fotosintetski aparat većim udjelom karotenoida.

- udjeli ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana u tkivu rosike su se povećali što ukazuje da ovi spojevi imaju ulogu u zaštiti rosika kod visokih intenziteta svjetlosti bilo da je štite od oksidacijskog stresa kao antioksidansi bilo da smanjuju količinu svjetlosne energije koja dolazi do fotosintetskog aparata.

## 7. LITERATURA

- Agati G., Tattini M. (2010): Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist* 186: 786-793.
- Albert N. W., Lewis D. H., Zhang H., Irving L. J., Jameson P. E., Davies K. M. (2009): Light - induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* 60(7): 2191-2202.
- Bruzzese B. M., Bowler R., Massicotte H. B., Fredeen A. L. (2010): Photosynthetic light response in three carnivorous plant species: *Drosera rotundifolia*, *D. capensis* and *Sarracenia leucophylla*. *Photosynthetica* 48(1): 103-109.
- Chalker - Scott L. (1999): Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70(1): 1-9.
- Close D. C., McArthur C. (2002): Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *OIKOS* 99: 166–172.
- Close D. C., Beadle C. L. (2003): The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review* 69(2): 149-161.
- Doboš M. (2012): Utjecaj sunčevog zračenja na mesojednu biljku *Drosera rotundifolia* L. Diplomski rad. Biološki odsjek PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Ellison A. M., Gotelli N. J. (2001.): Evolutionary ecology of carnivorous plants. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 623-629.
- Franck N., Winkler S., Pastenes C., Infante R. (2007): Acclimation to sun and shade of three accessions of the Chilean native berry-crop murta. *Agroforest Systems* 69: 215-229.
- Garcia - Plazaola J. I., Hernández A., Artetxe U., Becerril J. M. (2002): Regulation of the xanthophyll cycle pool size in duckweed (*Lemna minor*) plants. *Physiologia Plantarum* 116: 121-126.
- Givnish T. J., Burkhardt E. L., Happel R. E., Weintraub J. D. (1984): Carnivory in the Bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *American Naturalist* 124: 479-497.
- Gould S. K., Dudle D. A., Neufeld H. S. (2010): Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *Journal of Experimental Botany* 61: 2707–2717.
- Grace C. S., Logan A. B. (2000): Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenyl propanoid pathway. *The Royal Society* 355: 1499-1510.

- Hájek T., Adamec L. (2010): Photosynthesis and dark respiration of leaves of terrestrial carnivorous plants. *Biologia* 65(1): 69-74.
- Jaakola L., Määtä - Riihinen K., Kärenlampi S., Hohtola A. (2004): Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218: 721-728.
- Karageorgou P, Manetas Y. (2006): The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology* 26: 613-621.
- Karlson P. (1993): Biokemija, Školska knjiga, Zagreb.
- Król E., Plachno B. J., Adamec L., Stolarz M., Dziubińska H., Trębacz K. (2011): Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world“. *Annals of Botany* 109: 47-64.
- Lee J., Rennaker C., Wrolstad R. E. (2008): Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 110: 782-786.
- Lichtenthaler H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids—pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzimology* 148: 350-382
- Lichtenthaler H. K. (2007): Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92: 163-179.
- Lichtenthaler H. K., Burkart S.(1999): Photosynthesis and high light stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 25(3-4): 3-16.
- Maxwell K.,Johnson G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- Merzlyak M. N., Solovchenko A. E., Smagin A. I., Gitelson A. A. (2005): Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non -destructive assessment. *Journal of Plant Physiology* 162: 151-160.
- Miyake C., Amako K., Shiraishi N., Sugimoto T. (2009): Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system - relationship among the fraction of open PSII centers, non - photochemical quenching of chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. *Plant and Cell Physiology* 50(4): 730–743.
- Müller P., Li X. P., Niyogi K. K. (2001): Non - photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*: 125(4), 1558-1566.

- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Murchie E. H., Horton P. (1997): Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant, Cell and Environment* 20 (4): 438-488.
- Nikolić T., Topić J. (2005): Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske, Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska.
- Paiva É. A. S., Isaias R. M. S., Vale F. H. A., Queiroz C. G. S. (2003): The Influence of Light Intensity on Anatomical Structure and Pigment Contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom (Commelinaceae) Leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 617-624.
- Pevalek - Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja, Profil, Zagreb.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N. (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11): 1142-1145.
- Roger M. J. R., Weiss O. (2001): Fluorescence techniques. U: Roger M. J. (ur.) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer Netherlands, str. 155-171.
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany* 217037: 1.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela - Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin - Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Schreiber U., Hormann H., Neubauer C., Klughammer C. (1995): Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Functional Plant Biology*, 22(2): 209-220.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. (1999): Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb.
- Stancato G. C., Mazzafera P., Buckeridge M. S. (2002): Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. *The Revista Brasileira de Botânica* 25(2): 229-235.
- Steyn W. J., Wand S. J. E., Holcroft D. M., Jacobs G. (2002): Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349–361.

- Stryer L.(1991): Biokemija, Školska knjiga, Zagreb.
- Topić J., Vukelić J. (2009.): Priručnik za određivanje kopnenih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima u EU. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Thorén M. L., Tuomi J., Kämäräinen T., Laine K. (2003): Resource availability affects investment in carnivory in *Drosera rotundifolia*. New Phytologist 159: 507-511.
- Vidaković - Cifrek Ž., Pevalšek - Kozlina B., Tkalec M., Babić M., Radić Brkanac S. (2013): Praktikum iz fiziologije bilja. Skripta za internu upotrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Walters R. G. (2005): Towards an understanding of photosynthetic acclimation. Journal of Experimental Botany 56(411): 435-447.
- Korištene internet stranice:

[http://www.wiki-dveri.info/wiki/Cret\\_Dubravica](http://www.wiki-dveri.info/wiki/Cret_Dubravica)

<http://www.dubravica.hr/cretovi.html>

<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/10692>

## KRATKI ŽIVOTOPIS

### OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Martina Mužic  
Datum i mjesto rođenja: 31.12.1986., Varaždin  
Adresa stanovanja: Vinogradi Ludbreški 76 N, 42230 Ludbreg  
Telefon: 042/ 819 605, 091/ 760 3022  
E-mail: martina.muzic@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2005. - 2014. Fakultet: PMF – Biološki odsjek , Zagreb  
Smjer: integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije  
– nastavnički smjer  
2001. - 2005. Srednja škola: Poljoprivredna i veterinarska „Arboretum Opeka“  
Smjer: Veterinarski tehničar  
1994. - 2001. Osnova škola Ludbreg, A. Kačića Milošića 17, 42230 Ludbreg

### RADNO ISKUSTVO

Tijekom studija, odradila sam stručnu praksu iz oba predmeta. Kemiju u srednjoj školi „Zdravstveno učilište“, Zagreb te Biologiju u osnovnoj školi „Ante Kovačića“, Zagreb. Tijekom prakse mijenjala sam mentoricu na satovima biologije na tri školska sata zbog bolesti.

Tijekom studija radila sam sljedeće poslove:

2005. - 2014. Instrukcije iz biologije i kemije  
2007. - 2009. KOPIRAONA COPY ZOMA- kopiranje, rad sa ljudima i vođenje knjiga  
2010 . RRF - ovršna referada: evidencija polaznika tečajeva, zaprimanje i otpremanje pošte, administrativni poslovi  
2010. - 2012. VERIBO - dočekivanje gostiju, spremanje stanova i administrativni poslovi  
2012. - 2014. Čuvanje djece

### NAGRADE I PRIZNANJA

2004. Sudjelovanje na državnom ekološkom kvizu „Lijepa naša“  
2005. Sudjelovanje na županijskom natjecanju iz kemije  
2010. - 2014. Sudjelovanje na noći biologije kod mesojednih biljaka  
2011. / 2012. Dobitnica posebne Rektorove nagrade za sudjelovanje na noći biologije

### POSEBNE VJEŠTINE

Strani jezici: Engleski: aktivno u govoru i pismu  
Njemački: pasivno u govoru i pismu  
Računala: Microsoft Office, Windows, Internet, Movie Maker , Google SketchUp  
Vozačka dozvola: Da

### HOBİ I INTERESI

Uzgoj povrća, začinskog bilja i mesojednih biljaka, kulinarstvo, čitanje knjiga i stripova, ručni rad, izrada nakita.